(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 736 037**

(51) Int. CI.:

C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2011 E 15184291 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2982757**

(54) Título: **Elementos reguladores de las plantas y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

14.01.2010 US 295162 P
14.01.2010 US 295160 P
26.02.2010 US 339057 P
27.02.2010 US 308921 P
27.02.2010 US 308919 P
06.05.2010 US 331924 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2019

(73) Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Blvd.
St. Louis, MO 63167, US

(72) Inventor/es:

FLASINSKI, STANISLAW;
DIETRICH, CHARLES;
WU, WEI;
LI, ZHAO LONG;
QIU, BO-XING;
GUO, LIANG y
CHITOOR, JAISHREE M.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Elementos reguladores de las plantas y usos de los mismos

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la biología molecular de las plantas y a la ingeniería genética de las plantas y a las moléculas de ADN útiles para modular la expresión génica en plantas, y para especificar la localización intracelular o extracelular de un producto génico.

Antecedentes

Los elementos reguladores son elementos genéticos que regulan la actividad génica modulando la transcripción de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Dichos elementos incluyen promotores, líderes, intrones, y regiones 3' no traducidas y son útiles en el campo de la biología molecular de las plantas y en la ingeniería genética de las plantas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona novedosos elementos reguladores génicos para su uso en plantas. La presente invención también proporciona construcciones de ADN que comprenden los elementos reguladores. La presente invención también proporciona células de plantas transgénicas, plantas, y semillas que comprenden los elementos reguladores, operativamente unidos a una molécula de polinucleótido transcribible.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que comprende la SEQ ID NO: 272 o 790, en el que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga y en el que la expresión de dicho polinucleótido transcribible heterólogo está dirigida por un promotor constitutivo o por un promotor de raíz mejorado. En determinadas realizaciones de la molécula de ADN, la secuencia de ADN comprende un elemento regulador. En realizaciones particulares, la molécula de polinucleótido transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico, un gen capaz de proporcionar resistencia a herbicidas en plantas, o un gen capaz de proporcionar control de plagas en plantas.

La invención también proporciona una célula de una planta transgénica que comprende una construcción de ADN que comprende una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 272 o 790, en el que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga y en el que la expresión de dicho polinucleótido transcribible heterólogo está dirigida por un promotor constitutivo o por un promotor de raíz mejorado. En determinadas realizaciones, la célula de una planta transgénica es una célula de una planta monocotiledónea. En otras realizaciones, la célula de la planta transgénica es una célula de una planta dicotiledónea.

También se incluye una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende una molécula de ADN como se define aquí anteriormente en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporciona una planta de progenie de cualquier generación de dicha planta transgénica, o una parte de la misma. Además, se proporciona también una semilla transgénica, en el que la semilla comprende dicha molécula de ADN.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1a-1c representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 24-25 para el promotor Actina 8 del panizo común.
Las figuras 2a-2c representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 28-29 para el promotor Alc1 del panizo común.
Las figuras Las figuras 3a-3f representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 45-46 para el promotor Cys del panizo común.
Las figuras 4a-4f representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 47-48 para el promotor Dzs del panizo común.
Las figuras 5a 5c representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 58-59 para el promotor Gst del panizo común.
Las figuras 6a-6C representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 60-61 para el promotor Ifr del panizo común.
Las figuras 7a-7d representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 64-65 para el promotor Nrt2 del panizo común.
Las figuras 8a-8e representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 74-75 para el promotor Ppc del panizo común.
Las figuras 9a-9f representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 82-83 para el promotor Prx3 del panizo común.
Las figuras 10a-10f representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 88-91 para el promotor Rcc3 del panizo común.
Las figuras 11a-11b representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS:

93-94 para el promotor Sspl del panizo común.
Las figuras 12a-12d representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 96-97 para el promotor Tip del panizo común.
Las figuras 13a-13d representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 98-99 para el promotor Tubtail2-1 del panizo común.
Las figuras 14a-14c representan la alineación de las variantes de tamaño correspondientes a las SEQ ID NOS: 102-103 para el promotor Ubq1 del panizo común.
La figura 15 representa configuraciones del casete transgénico de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La invención desvelada en el presente documento proporciona moléculas de polinucleótidos que tienen genes reguladores u otra actividad beneficiosa procedentes del panizo común, *Setaria italica.* El diseño, la construcción y el uso de estas moléculas de polinucleótidos son un objeto de la presente invención. Las secuencias de nucleótidos de estas moléculas de ADN se proporcionan entre la SEQ ID NO: 272 y la SEQ ID NO: 790. Estas moléculas de polinucleótidos son capaces de alterar la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida de manera operativa en tejidos de plantas y, por tanto, pueden regular selectivamente la expresión génica, o la actividad de un producto génico codificado, en plantas transgénicas. También se desvelan procedimientos para modificar, producir y utilizar las mismas. También se desvelan composiciones, células hospedadoras transformadas, plantas transgénicas y semillas que contienen los promotores y las secuencias de nucleótidos de *S. italica* desveladas, y los procedimientos para preparar y usar las mismas.

Las siguientes definiciones y procedimientos se proporcionan para definir mejor la presente invención y para guiar a las personas normalmente expertas en la materia en la práctica de la presente invención. A menos que se indique otra cosa, los términos deben entenderse de acuerdo con la utilización convencional por las personas normalmente expertas en la materia.

Moléculas de ADN

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ADN" o "molécula de ADN" se refiere a una molécula de ADN bicatenario de origen genómico o sintético, es decir, un polímero de bases de desoxirribonucleótidos o una molécula de polinucleótido, leída desde el extremo 5 '(en la dirección 5') hasta el extremo 3' (en la dirección 3'). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. La nomenclatura utilizada en el presente documento es la requeridaspor el Título 37 del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos § 1.822, y se establece en las tablas de la Norma ST.25 (1998) de la WIPO, Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de ADN aislada" se refiere a una molécula de ADN al menos parcialmente separada de otras moléculas normalmente asociadas con la misma en su estado nativo o natural. En una realización, el término "aislado" se refiere a una molécula de ADN que está al menos parcialmente separada de los ácidos nucleicos que normalmente flanquean la molécula de ADN en su estado nativo o natural. Por tanto, las moléculas de ADN fusionadas a secuencias reguladoras o codificantes con las que no se asocian normalmente, por ejemplo, como resultado de técnicas recombinantes, se consideran aisladas en el presente documento. Dichas moléculas se consideran aisladas incluso cuando se integran en el cromosoma de una célula hospedadora o están presentes en una solución de ácido nucleico con otras moléculas de ADN.

Se puede utilizar cualquier número de procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para aislar y manipular una molécula de ADN, o un fragmento de la misma, desvelada en la presente invención. Por ejemplo, se puede usar la tecnología de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar una molécula de ADN de partida concreta y/o para producir variantes de la molécula original. Las moléculas de ADN, o fragmentos de las mismas, también se puede obtener mediante otras técnicas, como sintetizar directamente el fragmento por medios químicos, como se practica comúnmente utilizando un sintetizador de oligonucleótidos automatizado.

Tal como se usa en el presente documento, el término "identidad de secuencia" se refiere al grado en que dos secuencias de polinucleótidos alineadas óptimamente o dos secuencias de polipéptidos alineadas óptimamente son idénticas. Una alineación de secuencia óptima se crea manualmente alineando dos secuencias, por ejemplo, una secuencia de referencia y otra secuencia, para maximizar el número de correspondencias de nucleótidos en la alineación de la secuencia con inserciones, deleciones o huecos de nucleótidos internos adecuados. Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia proporcionada como las secuencias de polinucleótidos de las SEQ ID NOS: 272 y 790.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad" o "% de identidad" es la fracción de identidad multiplicada por 100. La "fracción de identidad" para una secuencia alineada de manera óptima con una secuencia de referencia es el número de correspondencias de nucleótidos en el alineamiento óptimo, dividido por el número total de nucleótidos en la secuencia de referencia, por ejemplo, el número total de nucleótidos en la longitud completa de la secuencia de referencia completa. Por tanto, se desvela una molécula de ADN que comprende una secuencia que cuando se alinea de manera óptima con una

secuencia de referencia, proporcionada en el presente documento como las SEQ ID NOS: 272 y 790, tiene aproximadamente un 85 por ciento de identidad o superior, aproximadamente un 90 por ciento de identidad o superior, aproximadamente un 95 por ciento de identidad o superior, o al menos un 96 por ciento de identidad, 97 por ciento de identidad, 98 por ciento de identidad, o 99 por ciento de identidad con la secuencia de referencia y tiene actividad reguladora de genes.

Elementos reguladores

Un elemento regulador es una molécula de ADN que tiene actividad reguladora de genes, es decir, una que tiene la capacidad de alterar la transcripción y/o la traducción de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. La expresión "actividad reguladora de genes" se refiere por tanto a la capacidad de alterar el patrón de expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente alterando la transcripción y/o la traducción de esa molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. La actividad reguladora de genes puede ser positiva y/o negativa y el efecto puede caracterizarse por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo, tisulares, ambientales, fisiológicas, patológicas, de ciclo celular y/o de sensibilidad química, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Los elementos reguladores tales como promotores, líderes, intrones y regiones de terminación de la transcripción son moléculas de ADN que tienen una actividad reguladora de genes y desempeñan un papel integral en la expresión global de los genes en células vivas. La expresión "elemento regulador" se refiere a una molécula de ADN que tiene actividad reguladora de genes, es decir, una que tiene la capacidad de alterar la transcripción y/o la traducción de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Los elementos reguladores aislados, como promotores y líderes, que actúan en plantas son, por tanto, útiles para modificar fenotipos de plantas mediante los procedimientos de ingeniería genética.

Los elementos reguladores pueden caracterizarse por su patrón de expresión, es decir, tal como constitutivo y/o por su patrón de expresión temporal, espacial, de desarrollo, tisular, ambiental, fisiológico, patológico, de ciclo celular y/o químicamente sensible, y cualquier combinación de las mismos, así como mediante indicaciones cuantitativas o cualitativas. Un promotor es útil como elemento regulador para modular la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente.

Tal como se usa en el presente documento, un "patrón de expresión génica" es cualquier patrón de transcripción de una molécula de ADN unida operativamente en una molécula de ARN transcrita. La expresión puede caracterizarse por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo, tisulares, ambientales, fisiológicas, patológicas, del ciclo celular y/o cualidades químicamente sensibles, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas. La molécula de ARN transcrita puede traducirse para producir una molécula de proteína o puede proporcionar una molécula de ARN de sentido contrario u otra molécula de ARN reguladora, como un ARNbc, un ARNt, un ARNr y un miARN.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "expresión de la proteína" es cualquier patrón de traducción de una molécula de ARN transcrita en una molécula de proteína. La expresión de proteínas puede caracterizarse por sus cualidades temporales, espaciales, de desarrollo, o morfológicas, así como por indicaciones cuantitativas o cualitativas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere en general a una molécula de ADN que está implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa II y otras proteínas (factores de transcripción que actúan en trans) para iniciar la transcripción. Un promotor puede aislarse inicialmente de la región 5' no traducida (5' UTR) de una copia genómica de un gen. Como alternativa, los promotores pueden ser moléculas de ADN producidas o manipuladas sintéticamente. Los promotores pueden ser también quiméricos, es decir, un promotor producido mediante la fusión de dos o más moléculas de ADN heterólogas. Los promotores desvelados en el presente documento incluyen las SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536 o fragmentos o variantes de las mismas.

Se incluyen fragmentos de una secuencia promotora desvelada en el presente documento. Los fragmentos promotores presentan actividad promotora, y pueden ser útiles solos o en combinación con otros promotores y fragmentos promotores, tal como en la construcción de promotores quiméricos. En realizaciones específicas, los fragmentos de un promotor desvelado en el presente documento comprenden al menos aproximadamente 50, 95, 150, 250, 500, o aproximadamente 750 nucleótidos contiguos de una molécula de polinucleótido que tiene actividad promotora desvelada en el presente documento.

Un promotor o un fragmento de promotor puede también analizarse con respecto a la presencia de elementos promotores conocidos, es decir, las características secuencias de ADN, tales como una secuencia TATA y otros motivos de sitios de unión de factores de transcripción conocidos. Un experto en la materia puede utilizar la identificación de dichos elementos promotores conocidos para diseñar variantes del promotor que tienen un patrón de expresión similar al del promotor original.

Tal como se usa en el presente documento, La expresión "potenciador" o "elemento potenciador" se refiere a un elemento regulador de la transcripción que actúa en cis, también conocido como elemento cis, que confiere un aspecto del modelo de expresión global, pero es habitualmente insuficiente solo para dirigir la transcripción, de una

secuencia polinucleotídica unida operativamente. A diferencia de los promotores, los elementos potenciadores no incluyen habitualmente un sitio de inicio de la transcripción (TSS) o una secuencia TATA. Un promotor puede comprender naturalmente uno o más elementos potenciadores que alteran la transcripción de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente. Un elemento potenciador aislado puede también fusionarse con un promotor para producir un elemento promotor quimérico en cis, que confiere un aspecto de la modulación global de la expresión génica. Un promotor o fragmento de promotor puede comprender uno o más elementos potenciadores que alteran la transcripción de los genes unidos operativamente. Se cree que muchos elementos potenciadores promotores se unen a las proteínas de unión al ADN y/o alteran la topología del ADN, produciendo conformaciones locales que permiten o restringen selectivamente el acceso de la ARN polimerasa al molde de ADN o que facilitan la apertura selectiva de la doble hélice en el sitio de inicio de la transcripción. Un elemento potenciador puede funcionar para unir los factores de transcripción que regulan la transcripción. Algunos elementos potenciadores se unen con más de un factor de transcripción, y los factores de transcripción pueden interactuar con diferentes afinidades con más de un dominio potenciador. Los elementos potenciadores pueden identificarse mediante varias técnicas, incluyendo el análisis de las deleciones, es decir la deleción de uno o más nucleótidos del extremo 5' o interno a un promotor; el análisis de las proteínas de unión al ADN utilizando la huella de la ADNasa I, la interferencia de la metilación, los ensayos de cambio de movilidad por electroforesis, la huella genómica *in vivo* mediante la PCR mediada por ligadura, y otros ensayos convencionales; o mediante el análisis de similitud de secuencias de ADN utilizando motivos de elementos en cis conocidos o elementos potenciadores como una secuencia diana o un motivo diana con procedimientos de comparación de secuencias de ADN convencionales, tales como BLAST. La estructura fina de un dominio potenciador puede estudiarse adicionalmente mediante mutagénesis (o sustitución) de uno o más nucleótidos o mediante otros procedimientos convencionales. Los elementos potenciadores se pueden obtener mediante síntesis química o mediante el aislamiento de elementos reguladores que incluyen dichos elementos, y se pueden sintetizar con nucleótidos flanqueantes adicionales que contienen sitios útiles de enzimas de restricción para facilitar la posterior manipulación. Por tanto, el diseño, la construcción y el uso de elementos potenciadores de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para modular la expresión de moléculas de polinucleótidos transcribibles unidas operativamente están abarcados por la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término "líder" se refiere a una molécula de ADN aislada de la región 5' no traducida (5' UTR) de una copia genómica de un gen y definida en general como un segmento de nucleótidos entre el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el sitio de inicio de la secuencia codificante de la proteína. Como alternativa, los líderes pueden ser elementos de ADN producidos o manipulados sintéticamente. Se puede usar un líder como un elemento 5' regulador para modular la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Las moléculas líder pueden utilizarse con un promotor heterólogo o con su promotor nativo. Las moléculas promotoras utilizadas en la presente invención pueden por tato unirse operativamente a su líder nativo o pueden estar unidas operativamente a un líder heterólogo. Las secuencias líder desveladas en el presente documento incluyen las SEQ ID NOS: 106 a 171 y las SEQ ID NOS: 537 a 588 o fragmentos o variantes de las mismas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "quimérico" se refiere a una única molécula de ADN producida mediante la fusión de una primera molécula de ADN con una segunda molécula de ADN, en la que ni la primera ni la segunda molécula de ADN estarían normalmente contenidas en esa configuración, es decir, fusionado con la otra. La molécula de ADN quimérico es por tanto una nueva molécula de ADN que no se encuentra normalmente de otra forma en la naturaleza. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "promotor quimérico" se refiere a un promotor producido mediante dicha manipulación de moléculas de ADN. Un promotor quimérico puede combinar dos o más fragmentos de ADN; un ejemplo sería la fusión de un promotor con un elemento potenciador. Por tanto, el diseño, la construcción y el uso de promotores quiméricos de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento para modular la expresión de moléculas de polinucleótidos transcribibles unidas operativamente están abarcados en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "variante" se refiere a una segunda molécula de ADN que es de composición similar, pero no idéntica a, una primera molécula de ADN, y así la segunda molécula de ADN sigue manteniendo la funcionalidad general, es decir, un patrón de expresión igual o similar, de la primera molécula de ADN. Una variante puede ser una versión más corta o truncada de la primera molécula de ADN y/o una versión alterada de la secuencia de la primera molécula de ADN, como una con diferentes sitios de enzimas de restricción y/o deleciones, sustituciones y/o inserciones internas. Una "variante" puede también abarcar un elemento regulador que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más nucleótidos de una secuencia de referencia, en la que el elemento regulador derivado tiene actividad de la transcripción o la traducción mayor o menor o equivalente a la molécula reguladora precursora correspondiente. Las "variantes" de elementos reguladores abarcarán también variantes que surgen de mutaciones que se producen de forma natural en la transformación de células bacterianas y vegetales. Por tanto, una secuencia de polinucleótido proporcionada como las SEQ ID NOS: 272 y 790 se puede usar para crear variantes que tienen una composición similar, pero no idéntica a, la secuencia de polinucleótido del elemento regulador original, mientras se mantiene la funcionalidad general, es decir, un patrón de expresión igual o similar, del elemento regulador original. La producción de dichas variantes está bien comprendida en los conocimientos de la persona normalmente experta en la materia a la luz de la divulgación. Las "variantes" de elementos reguladores quiméricos comprenden los mismos elementos constituyentes que una secuencia de referencia, pero los elementos constituyentes que comprenden el elemento

regulador quimérico pueden unirse operativamente mediante varios procedimientos conocidos en la técnica, tales como, digestión y ligadura mediante enzimas de restricción, clonación independiente de ligadura, ensamblaje modular de productos de la PCR durante la amplificación, o síntesis química directa del elemento regulador así como otros procedimientos conocidos en la materia. La "variante" del elemento regulador quimérico resultante puede comprender los mismos, o variantes de los mismos, elementos constituyentes de la secuencia de referencia, pero difieren en la secuencia o secuencias que comprenden la secuencia o secuencias de unión que permiten que las partes constituyentes se unan operativamente. En la presente invención, una secuencia de polinucleótido proporcionada como las SEQ ID NOS: 272 y 790 proporcionan una secuencia de referencia en la que los elementos constituyentes que comprenden la secuencia de referencia pueden unirse mediante procedimientos conocidos en la técnica y pueden comprender sustituciones, deleciones y/o inserciones de uno o más nucleótidos o mutaciones que se producen de forma natural en la transformación de células bacterianas y vegetales.

Construcciones

Tal como se usa en el presente documento, el término "construcción" significa cualquier molécula de polinucleótido recombinante tal como un plásmido, cósmido, virus, molécula de polinucleótido que se replica de forma autónoma, fago o molécula de polinucleótido de ADN o ARN monocatenario o bicatenario, lineal o circular, procedente de cualquier fuente, con capacidad de integración genómica o replicación autónoma, que comprende una molécula de polinucleótido en la que una o más moléculas de polinucleótidos se han enlazado de manera funcionalmente operativa, es decir, unidas operativamente. Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" significa cualquier construcción de polinucleótidos recombinante que se puede usar para el fin de la transformación, es decir, la introducción de ADN heterólogo en una célula hospedadora.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a una primera molécula unida a una segunda molécula, en la que las moléculas están dispuestas de tal manera que la primera molécula afecta la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden ser parte o no de una única molécula contigua y pueden ser adyacentes o no. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible si el promotor modula la transcripción de la molécula de polinucleótido transcribible de interés en una célula.

Las construcciones de la presente invención son generalmente construcciones de ADN de límite doble de plásmido Ti que tienen las regiones del límite derecho (RB o AGRtu.RB) y del límite izquierdo (LB o AGRtu.LB) del plásmido Ti aisladas de *Agrobacterium tumefaciens* que comprenden un ADN-T, que junto con las moléculas de transferencia proporcionadas por las células de *A. tumefaciens*, permiten la integración del ADN-T en el genoma de una célula vegetal (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 6.603.061). Las construcciones pueden contener también segmentos de ADN de la cadena principal del plásmido que proporcionan función de replicación y selección de antibióticos en células bacterianas, por ejemplo, un origen de replicación de *Escherichia coli* tal como *ori*322, un origen de replicación de una amplia gama de hospedadores como *oriV* u oriRi, y una región codificante para un marcador seleccionable como Espec/Estrp que codifica la aminoglucósido adeniltransferasa *(aadA)* de Tn7 que confiere resistencia a la espectinomicina o estreptomicina o un gen marcador seleccionable de gentamicina (Gm, Gent). Para la transformación de plantas, la cepa bacteriana hospedadora es a menudo *A. tumefaciens* ABI, C58 o LBA4404; sin embargo, otras cepas conocidas por los expertos en la materia de la transformación de plantas pueden funcionar en la presente invención.

Se conocen en la materia procedimientos para ensamblar e introducir construcciones en una célula de tal manera que la molécula de polinucleótido transcribible se transcriba en una molécula de ARNm funcional que se traduce y expresa como un producto de proteína. Para la práctica de la presente invención, las composiciones y procedimientos convencionales para preparar y utilizar construcciones y células hospedadoras son bien conocidos por los expertos en la materia, véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición Volúmenes 1, 2 y 3 (2000) J.F. Sambrook, D.W. Russell y N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los procedimientos para fabricar vectores recombinantes particularmente adecuados para la transformación de plantas incluyen los descritos en las patentes de EE. UU. números 4.971.908; 4.940.835; 4.769.061; y 4.757.011. Estos tipos de vectores también se han revisado en la literatura científica (véase, por ejemplo, Rodriguez, y col., Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston, (1988) y Glick, y col., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, FL. 1993)). Los vectores típicos útiles para la expresión de ácidos nucleicos en plantas superiores son bien conocidos en la técnica e incluyen vectores derivados del plásmido inductor de tumores (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens* (Rogers, y col., Methods in Enzymology 153: 253-277 (1987)). Otros vectores recombinantes útiles para la transformación de plantas, incluyendo el vector de control de transferencia pCaMVCN, también se han descrito en la literatura científica (véase, por ejemplo, Fromm, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824-5828 (1985)).

Pueden incluirse varios elementos reguladores en una construcción. Cualquiera de dichos elementos reguladores puede proporcionarse en combinación con otros elementos reguladores. Dichas combinaciones se pueden diseñar o modificar para producir características reguladoras deseables. Las construcciones de la presente invención comprenderían típicamente al menos un elemento regulador unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible operativamente unida a una molécula 3' de terminación de transcripción.

Las construcciones de la presente invención pueden incluir cualquier promotor o líder conocido en la técnica. Por ejemplo, un promotor de la presente invención puede estar unido operativamente a un líder heterólogo no traducido en 5' tal como uno derivado de un gen de la proteína de choque térmico (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.659.122 y 5.362.865). Como alternativa, un líder utilizado en la presente invención puede estar unido operativamente a un promotor heterólogo tal como el promotor de la transcripción del Virus de Mosaico de la Coliflor 35S (véase, la patente de Estados Unidos n.º 5.352.605).

Tal como se usa en el presente documento, el término "intrón" se refiere a una molécula de ADN que puede aislarse o identificarse de la copia genómica de un gen y puede definirse en general como una región retirada por corte y empalme durante el procesamiento del ARNm antes de la traducción. Como alternativa, un intrón puede ser un elemento de ADN producido o manipulado sintéticamente. Un intrón puede contener elementos potenciadores que efectúan la transcripción de genes unidos operativamente. Un intrón puede utilizarse como un elemento regulador para modular la expresión de una molécula de polinucleótido transcribible unida operativamente. Una construcción de ADN puede comprender un intrón, y el intrón puede ser heterólogo o no con respecto a la secuencia de la molécula de polinucleótido transcribible. Los ejemplos de intrones en la técnica incluyen el intrón de la actina del arroz (patente de EE.UU. n.º 5.641.876) y el intrón HSP70 del maíz (patente de EE.UU. n.º 5.859.347). Los intrones desvelados en el presente documento incluyen las SEQ ID NOS: 172 a 267, SEQ ID NOs: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de terminación de la transcripción 3'" o "3' UTR" se refiere a una molécula de ADN que se usa durante la transcripción para producir la región 3' no traducida (3' UTR) de una molécula de ARNm. La región 3' no traducida de una molécula de ARNm puede generarse mediante escisión específica y poliadenilación en 3', también conocido como cola poliA. Una 3' UTR puede estar unida operativamente a y localizada en la dirección 3' de una molécula de polinucleótido transcribible y puede incluir polinucleótidos que proporcionan una señal de poliadenilación y otras señales reguladoras capaces de afectar la transcripción, el procesamiento del ARNm o la expresión génica. Se piensa que las colas de poliA funcionan en la estabilidad del ARNm y en el inicio de la traducción. Ejemplos de moléculas 3' de terminación de la transcripción en la técnica son la región 3' de la nopalina sintasa (véase, Fraley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4803-4807 (1983)); la región 3' de hsp17 del trigo; la región 3' de la subunidad pequeña rubisco del guisante; la región 3' de E6 del algodón (patente de Estados Unidos 6.096.950); regiones 3' desveladas en el documento WO00/11200; y la 3' UTR de coixina (patente de Estados Unidos n.º 6.635.806). Las secuencias de las regiones 3' UTR útiles en la práctica de la presente invención se proporcionan como SEQ ID NOS: 272 y 790.

Las 3' UTR son un requisito previo básico para la expresión recombinante de genes específicos. En sistemas animales, una maquinaria de 3' UTR ha sido bien definida (por ejemplo, Zhao y col., Microbial Mol Biol Rev 63: 405-445 (1999); Proudfoot, Nature 322:562-565 (1986); Kim y col., Biotechnology Progress 19:1620-1622 (2003); Yonaha y Proudfoot, EMBO J. 19:3770-3777 (2000); Cramer y col., FEBS Letters 498:179-182 (2001); Kuerstem y Goodwin, Nature Reviews Genetics 4:626-637 (2003)). Se requiere una terminación eficaz de la transcripción del ARN para evitar la transcripción no deseada de secuencias no relacionadas con los rasgos (en la dirección 3'), que puede interferir con el comportamiento del rasgo (véase más abajo para más detalles). La disposición de múltiples casetes de expresión génica en proximidad local entre sí (por ejemplo, en un ADN-T) puede dar lugar a la supresión de la expresión génica de uno o más genes en dicha construcción en comparación con las inserciones independientes (Padidam y Cao, BioTechniques 31:328-334 (2001). Esto puede interferir con la consecución de los niveles adecuados de expresión, por ejemplo, en casos en los que se desea una fuerte expresión génica de todos los casetes.

En plantas, no se conocen secuencias de señalización de la poliadenilación claramente definidas. Hasegawa y col., Plant J. 33:1063-1072, (2003)) no pudieron identificar secuencias de señalización de la poliadenilación conservadas en sistemas *in vitro* e *in vivo* en *Nicotiana sylvestris* y para determinar la longitud real del transcrito primario (no poliadenilado). Una 3' UTR débil tiene el potencial de generar una lectura íntegra, que puede alterar la expresión de los genes localizados en los casetes de expresión adyacentes (Padidam y Cao, BioTechniques 31:328-334 (2001)). El control adecuado de la terminación de la transcripción puede evitar la lectura íntegra en secuencias (por ejemplo, otros casetes de expresión) localizadas en la dirección 3' y puede permitir además un reciclado eficaz de la ARN polimerasa, para mejorar la expresión génica. Una terminación eficaz de la transcripción (liberación de la ARN polimerasa II procedente del ADN) es el requisito previo para el reinicio de la transcripción y por tanto afecta directamente al nivel de transcripción global. Después de la terminación de la transcripción, el ARN maduro se libera desde el sitio de síntesis y el molde al citoplasma. Los ARNm eucariotas se acumulan como formas poli(A) *in vivo,* de tal manera que es difícil detectar los sitios de terminación de la transcripción mediante procedimientos convencionales. Sin embargo, la predicción de 3' UTR funcionales y eficaces mediante procedimientos bioinformáticos es difícil ya que no existen secuencias conservadas que permitirían una predicción fácil de una 3' UTR eficaz.

Desde un punto de vista práctico, se prefiere que una 3' UTR utilizada en un casete transgénico tenga las siguientes características. La 3' UTR debe ser capaz de terminar eficaz y eficientemente la transcripción del transgén y evitar la lectura íntegra del transcrito en cualquier secuencia de ADN adyacente que puede estar compuesta de otro casete del transgén como en el caso de múltiples casetes que residen en un ADN-T o en el ADN cromosómico adyacente en el que se ha insertado el ADN-T. Las 3' UTR no deberían provocar una reducción en la actividad de la

transcripción transmitida por el promotor, el líder y los intrones que se utilizan para impulsar la expresión del transgén. En biotecnología de plantas, la 3' UTR se usa a menudo para el cebado de las reacciones de amplificación del ARN transcrito de forma inversa extraído de la planta transformada y utilizado para (1) evaluar la actividad de la transcripción o la expresión del casete transgénico una vez integrado en el cromosoma de la planta; (2) evaluar el número de copias de inserciones en el ADN de la planta; y (3) evaluar la cigosidad de la semilla resultante tras el cultivo. La 3' UTR se utiliza también en reacciones de amplificación del ADN extraído de la planta transformada para caracterizar la integridad del casete insertado.

Las 3' UTR útiles para proporcionar la expresión de un transgén en plantas se identifican basándose en la expresión de marcadores de secuencia expresados (EST) en bibliotecas de ADNc preparadas a partir de ARN mensajero aislado de semillas, flores y otros tejidos obtenidos de panizo común *(Setaria italica* (L.) Beauv). Las bibliotecas de ADNc están hechas de tejidos aislados de *S. italica* utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica a partir de tejidos de flores, semillas, hojas y raíces. Los ADNc resultantes se secuencian utilizando diversos procedimientos de secuenciación conocidos en la técnica. Los EST resultantes se ensamblan en grupos utilizando software bioinformático tal como clc_ref_assemble_complete versión 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). Se determinó la abundancia de transcritos de cada grupo contando el número de lecturas de ADNc para cada grupo. Las 3' UTR identificadas pueden estar compuestas de secuencias derivadas de una secuencia de ADNc así como secuencias derivadas de ADN genómico. La secuencia de ADNc se usa para diseñar cebadores, que luego se utilizan con bibliotecas GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 3' de la secuencia de ADN genómica correspondiente para proporcionar una secuencia de terminación más larga. El análisis de la abundancia relativa de transcritos, ya sea por conteos directos o por conteos normalizados de lecturas de secuencias observadas para cada biblioteca de tejidos, se puede usar para inferir propiedades sobre patrones de expresión. Por ejemplo, algunas 3' UTR pueden encontrarse en transcritos que se observan en mayor abundancia en el tejido de la raíz a diferencia de la hoja. Esto sugiere que el transcrito está muy expresado en la raíz y que las propiedades de expresión de la raíz pueden ser atribuibles a la regulación de la transcripción del promotor, la secuencia líder, los intrones o las 3' UTR. Pruebas empíricas de la 3' UTR identificadas por las propiedades de expresión en los órganos, tejidos o tipos de células específicos pueden dar como resultado la identificación de 3' UTR que mejoran la expresión en esos órganos, tejidos o tipos de células específicos.

Las construcciones y los vectores pueden incluir también una secuencia codificante de un péptido de tránsito que expresa un péptido unido que es útil para dirigirse a un producto proteico, particularmente a un cloroplasto, leucoplasto u otro orgánulo plastídico; mitocondria; peroxisoma; vacuola; o una localización extracelular. Para descripciones del uso de péptidos de tránsito de cloroplastos, véanse las patentes de Estados Unidos n.º 5.188.642 y 5.728.925. Muchas proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito del cloroplasto (CTP, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de dichas proteínas de cloroplastos aisladas incluyen las asociadas con la subunidad pequeña (SSU) de la ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidorreductasa, la proteína I y la proteína II del complejo recolector de luz, tiorredoxina F, enolpiruvil sikimato fosfato sintasa (EPSPS), y los péptidos de tránsito descritos en la patente de Estados Unidos n.º 7.193.133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas no de cloroplasto pueden dirigirse al cloroplasto mediante el uso de fusiones de proteínas con un CTP heterólogo y que el CTP es suficiente para dirigir una proteína al cloroplasto. La incorporación de un péptido de tránsito cloroplástico adecuado como el de *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) *(*Véase*,* Klee y col., Mol. Gen. Genet. 210: 437-442 (1987)) o la *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) *(*véase*,* della-Cioppa y col., Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 83: 6873-6877 (1986)) ha demostrado dirigir secuencias de proteínas EPSPS heterólogas a cloroplastos en plantas transgénicas (véanse, las patentes Estados Unidos números 5.627.061; 5.633.435; y 5.312.910 y los documentos EP 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299). Las secuencias que codifican los péptidos de tránsito desvelados en el presente documento se proporcionan como SEQ ID NOS: 277 a 316. Las secuencias de proteínas de los péptidos de tránsito desvelados critos en el presente documento se proporcionan como SEQ ID NOS: 324 a 350.

Moléculas de polinucleótidos transcribibles

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de polinucleótido transcribible" se refiere a cualquier molécula de ADN capaz de transcribirse en una molécula de ARN, que incluye, aunque no de forma limitativa, las que tienen secuencias codificantes de proteínas y las que tienen secuencias útiles para la supresión génica. Un "transgén" se refiere a una molécula de polinucleótido transcribible heteróloga a una célula hospedadora y/o una molécula de polinucleótido transcribible artificialmente incorporada en el genoma de una célula hospedadora.

Un promotor está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible que es heteróloga con respecto a la molécula promotora. Tal como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a la combinación de dos o más moléculas de polinucleótidos cuando dicha combinación no se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, las dos moléculas pueden obtenerse de diferentes especies y/o las dos moléculas pueden obtenerse de diferentes genes, por ejemplo, diferentes genes de la misma especie o los mismos genes de diferentes especies. Por lo tanto, un promotor es heterólogo con respecto a una molécula de ADN transcribible unida operativamente si dicha combinación normalmente no se encuentra en la naturaleza, es decir, esta molécula de polinucleótido transcribible no se produce de forma natural unida operativamente en combinación con esta molécula

promotora.

La molécula de polinucleótido transcribible puede ser en general cualquier molécula de ADN para la cual se desea la expresión de un transcrito de ARN. Dicha expresión de un transcrito de ARN puede dar como resultado la traducción de la molécula de ARNm resultante y, por lo tanto, la expresión de proteínas. Como alternativa, una molécula de polinucleótido transcribible puede diseñarse para provocar en última instancia una expresión disminuida de un gen o proteína específico. Esto puede lograrse utilizando una molécula de polinucleótido transcribible que esté orientada en la dirección de sentido contrario. Un experto en la materia está familiarizado con la utilización de dicha tecnología de sentido contrario. En resumen, a medida que se transcribe la molécula de polinucleótido transcribible de sentido contrario, el producto de ARN se hibrida y secuestra una molécula de ARN complementaria en el interior de la célula. Esta molécula de duplete de ARN no se puede traducir a una proteína mediante la maquinaria de traducción de la célula y se degrada en la célula. Cualquier gen puede regularse negativamente de esta manera.

Por tanto, una realización de la invención es un elemento regulador de las SEQ ID NOS: 272 y 790, unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible para modular la transcripción de la molécula de polinucleótido transcribible a un nivel deseado o en un patrón deseado tras la introducción de dicha construcción en una célula vegetal. En una realización, la molécula de polinucleótido transcribible comprende una región codificadora de proteínas de un gen, y el promotor afecta la transcripción de una molécula de ARN que se traduce y expresa como un producto proteico. En otra realización, la molécula de polinucleótido transcribible comprende una región de sentido contrario de un gen, y el promotor afecta a la transcripción de una molécula de ARN de sentido contrario u otra molécula de ARN inhibidora similar para inhibir la expresión de una molécula de ARN específica de interés en una célula hospedadora diana.

Genes de interés agronómico

Las moléculas de polinucleótidos transcribibles pueden ser genes de interés agronómico. Tal como se usa en el presente documento, el término "gen de interés agronómico" se refiere a una molécula de polinucleótido transcribible que cuando se expresa en un tejido vegetal, célula, o tipo de célula particular, proporciona una característica deseable asociada con la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, rendimiento, producto, perfil nutricional de la planta, resistencia a enfermedades o plagas, y/o tolerancia ambiental o química. Los genes de interés agronómico incluyen los que codifican una proteína de rendimiento, una proteína de resistencia al estrés, una proteína de control del desarrollo, una proteína de diferenciación tisular, una proteína de meristemo, una proteína ambientalmente sensible, una proteína de senescencia, una proteína sensible a hormonas, una proteína de abscisión, una proteína fuente, una proteína de sumidero, una proteína de control de las flores, una proteína de semilla, una proteína de resistencia a herbicidas, una proteína de resistencia a la enfermedad, una enzima biosintética de ácidos grasos, una enzima biosintética de tocoferol, una enzima biosintética de aminoácidos, una proteína plaguicida, o cualquier otro agente, como una molécula de sentido contrario o ARNi que se dirige a un gen particular para la supresión. El producto de un gen de interés agronómico puede actuar en la planta a fin de producir un efecto en la fisiología o metabolismo de la planta o puede actuar como un agente plaguicida en la dieta de una plaga que se alimenta de la planta.

Se puede incorporar un promotor en una construcción de tal manera que el promotor esté unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible que sea un gen de interés agronómico. La expresión del gen de interés agronómico es deseable a fin de conferir un rasgo agronómicamente beneficioso. Un rasgo agronómicamente beneficioso puede ser, por ejemplo, tolerancia a herbicidas, control de insectos, rendimiento modificado, resistencia a enfermedades fúngicas, resistencia a virus, resistencia a nematodos, resistencia a enfermedades bacterianas, crecimiento y desarrollo de la planta, producción de almidón, producción de aceites modificados, producción elevada de aceite, contenido de ácidos grasos modificado, producción elevada de proteínas, maduración del fruto, nutrición animal y humana potenciada, biopolímeros, resistencia al estrés ambiental, péptidos farmacéuticos y péptidos secretables, rasgos de procesamiento mejorados, digestibilidad mejorada, producción de enzimas, sabor, fijación de nitrógeno, producción de semillas híbridas, producción de fibra y producción de biocombustibles. Los ejemplos de genes de interés agronómico conocidos en la materia incluyen aquellos de resistencia a herbicidas (patentes de Estados Unidos números 6.803.501; 6.448.476; 6.248.876; 6.225.114; 6.107.549; 5.866.775; 5.804.425; 5.633.435; y 5.463.175), el aumento en el rendimiento (patentes de Estados Unidos números USRE38.446; 6.716.474; 6.663.906; 6.476.295; 6.441.277; 6.423.828; 6.399.330; 6.372.211; 6.235.971; 6.222.098; y 5.716.837), el control de insectos (patentes de Estados Unidos números 6.809.078; 6.713.063; 6.686.452; 6.657.046; 6.645.497; 6.642.030; 6.639.054; 6.620.988; 6.593.293; 6.555.655; 6.538.109; 6.537.756; 6.521.442; 6.501.009; 6.468.523; 6.326.351; 6.313.378; 6.284.949; 6.281.016; 6.248.536; 6.242.241; 6.221.649; 6.177.615; 6.156.573; 6.153.814; 6.110.464; 6.093.695; 6.063.756; 6.063.597; 6.023.013; 5.959.091; 5.942.664; 5.942.658, 5.880.275; 5.763.245; y 5.763.241), la resistencia a enfermedades fúngicas,(patentes de Estados Unidos números 6.653.280; 6.573.361; 6.506.962; 6.316.407; 6.215.048; 5.516.671; 5.773.696; 6.121.436; 6.316.407; y 6.506.962), la resistencia a virus (patentes de Estados Unidos números 6.617.496; 6.608.241; 6.015.940; 6.013.864; 5.850.023; y 5.304.730), la resistencia a nemátodos (patente de Estados Unidos n.º 6.228.992), la resistencia a enfermedades bacterianas (patente de Estados Unidos n.º 5.516.671), el crecimiento y desarrollo de plantas (patentes de Estados Unidos números 6.723.897 y 6.518.488), la producción de almidón (patentes de Estados Unidos números 6.538.181; 6.538.179; 6.538.178; 5.750.876; 6.476.295), la producción de aceites modificada (patentes de Estados Unidos números 6.444.876; 6.426.447; y 6.380.462), la producción elevada de aceite (patentes de Estados Unidos números

6.495.739; 5.608.149; 6.483.008; y 6.476.295), el contenido de ácidos grasos modificado (patentes de Estados Unidos números 6.828.475; 6.822.141; 6.770.465; 6.706.950; 6.660.849; 6.596.538; 6.589.767; 6.537.750; 6.489.461; y 6.459.018), la producción elevada de proteínas (patente de Estados Unidos n.º 6.380.466), la maduración del fruto (patente de Estados Unidos n.º 5.512.466), la nutrición animal y humana potenciada (patentes de Estados Unidos números 6.723.837; 6.653.530; 6.5412/59; 5.985.605; y 6.171.640), los biopolímeros (patentes de Estados Unidos n.º USRE37.543; 6.228.623; y 5.958.745, y 6.946.588), la resistencia al estrés ambiental (Patente de Estados Unidos n.º 6.072.103), los péptidos farmacéuticos y péptidos secretables (Patentes de Estados Unidos números 6.812.379; 6.774.283; 6.140.075; y 6.080.560), los rasgos de procesamiento mejorados (patente de Estados Unidos n.º 6.476.295), la digestibilidad mejorada (patente de Estados Unidos n.º 6.531.648), la baja en rafinosa (patente de Estados Unidos n.º 6.166.292), la producción de enzimas industriales (patente de Estados Unidos n.º 5.543.576), la mejora del sabor (patente de Estados Unidos n.º 6.011.199), la fijación de nitrógeno (patente de Estados Unidos n.º 5.229.114), la producción de semillas híbridas (patente de Estados Unidos n.º 5.689.041), la producción de fibra (patentes de Estados Unidos números 6.576.818; 6.271.443; 5.981.834; y 5.869.720) y la producción de biocombustible (patente de Estados Unidos n.º 5.998.700).

Como alternativa, un gen de interés agronómico puede alterar las características o el fenotipo de las plantas anteriormente mencionadas codificando una molécula de ARN que produce la modulación dirigida de la expresión génica de un gen endógeno, por ejemplo, mediante un ARN inhibidor de sentido contrario (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.107.065) ("ARNi", incluyendo la modulación de la expresión génica a través de miRNA, ARNip, ARNip que actúa en trans, y mecanismos por fases mediados por ARNs, por ejemplo, como se describe en las solicitudes publicadas US 2006/0200878, 2008/0066206 y 2009/0070898); o mecanismos mediados por cosupresión. El ARN podría ser también una molécula de ARN catalítico (por ejemplo, una ribozima o un riboswitch; véase, por ejemplo, el documento US 2006/0200878) diseñado para escindir un producto de ARNm endógeno deseado. Por tanto, cualquier molécula de polinucleótido transcribible que codifica una molécula de ARN transcrito que altera un fenotipo o cambio de morfología agronómicamente importante de interés puede ser útil para la práctica de la presente invención. Se conocen en la técnica procedimientos para construir e introducir construcciones en una célula de tal manera que la molécula de polinucleótido transcribible se transcriba en una molécula que sea capaz de provocar supresión génica. Por ejemplo, la supresión de genes posterior a la transcripción que utiliza una construcción con una molécula de polinucleótido transcribible orientada en sentido contrario para regular la expresión de genes en células vegetales se desvela en las patentes de Estados Unidos números 5.107.065 y 5.759.829, y la supresión de genes posterior a la transcripción utilizando una construcción con una molécula de polinucleótido transcribible orientada en sentido directo para regular la expresión génica en plantas se describe en las patentes de Estados Unidos números 5.283.184 y 5.231.020. La expresión de una molécula de un polinucleótido transcribible en una célula vegetal también se puede utilizar para suprimir plagas de plantas que se alimentan de la célula vegetal, por ejemplo, composiciones aisladas de plagas de coleópteros (publicación de patente de Estados Unidos n.º US2007/0124836) y composiciones aisladas de plagas de nematodos (publicación de patente de Estados Unidos n.º US2007/0250947). Las plagas de plantas incluyen plagas de artrópodos, plagas de nemátodos y plagas fúngicas o microbianas. Las moléculas de polinucleótidos transcribibles ilustrativas para su incorporación a construcciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN o genes de una especie diferente que la de la especie diana o genes que se originan o están presentes en la misma especie, pero que se incorporan en células receptoras mediante procedimientos de ingeniería genética en lugar de técnicas de reproducción o cultivo clásicas. El tipo de molécula de polinucleótido puede incluir, aunque no de forma limitativa, una molécula de polinucleótido que ya está presente en la célula vegetal, una molécula de polinucleótido de otra planta, una molécula de polinucleótido de un organismo diferente o una molécula de polinucleótido generada externamente, tal como una molécula de polinucleótido que contiene un mensaje de sentido contrario de un gen, o una molécula de polinucleótido que codifica una versión artificial, sintética, o modificada de otro modo, de un transgén.

Marcadores seleccionables

Como se usa en el presente documento, el término "marcador" se refiere a cualquier molécula de polinucleótido transcribible cuya expresión, o ausencia de la misma, puede ser evaluada o puntuada de alguna manera. Los genes marcadores para su uso en la práctica de la presente invención incluyen moléculas de polinucleótidos transcribibles que codifican β-glucuronidasa (GUS descrita en la patente de Estados Unidos n.º 5.599.670), proteína verde fluorescente y variantes de la misma (GFP descrita en las patentes de Estados Unidos números 5.491.084 y 6.146.826), proteínas que confieren resistencia a los antibióticos, o proteínas que confieren tolerancia a los herbicidas. Los marcadores de resistencia a los antibióticos útiles, incluyendo los que codifican proteínas que confieren resistencia a la kanamicina *(nptII),* higromicina B *(aph IV),* estreptomicina o la espectinomicina *(aad,* espec/estrep) y la gentamicina *(aac3* y *aacC4)* son conocidos en la técnica. Los herbicidas para los cuales se ha demostrado tolerancia a las plantas transgénicas y puede aplicarse el procedimiento de la presente invención, incluyen: ácido aminometilfosfónico, glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinilo, delapón, dicamba, ciclohezanodiona, inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa, y herbicidas de isoxasflutol. Las moléculas de polinucleótidos transcribibles que codifican proteínas involucradas en la tolerancia a herbicidas son conocidas en la técnica, e incluyen una molécula de polinucleótido transcribible que codifica la 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS para la tolerancia al glifosato descrita en las patentes de Estados Unidos Números 5.627.061; 5.633.435; 6.040.497; y 5.094.945); una molécula de polinucleótido transcribible que codifica una glifosato oxidorreductasa y una glifosato-N-acetil transferasa (GOX descrita en la patente de Estados Unidos N.º 5.463.175;

GAT descrita en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2003/0083480, y dicamba monooxigenasa en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2003/0135879); una molécula de polinucleótido transcribible que codifica bromoxinil nitrilasa *(Bxn* para la tolerancia a bromoxinilo descrita en la patente de Estados Unidos n.º 4.810.648); una molécula de polinucleótido transcribible que codifica la fitoeno desaturasa *(crtI)* descrita en Misawa, y col., Plant Journal 4:833-840 (1993) y Misawa, y col., Plant Journal 6:481-489 (1994) para la tolerancia a norflurazon; una molécula de polinucleótido transcribible que codifica la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, también conocida como ALS) descrita en Sathasiivan, y col., Nucl. Acids Res. 18:2188-2193 (1990) para la tolerancia a los herbicidas de sulfonilurea; y el gen *bar* descrito en DeBlock, y col., EMBO Journal 6:2513-2519 (1987) para la tolerancia al glufosinato y bialafos. Las moléculas promotoras de la presente invención pueden expresar moléculas de polinucleótidos transcribibles enlazadas que codifican la fosfinotricina acetil transferasa, EPSPS resistente a glifosato, aminoglucósido fosfotransferasa, hidroxifenil piruvato deshidrogenasa, higromicin fosfotransferasa, neomicin fosfotransferasa, dalapón deshalogenasa, nitrilasa resistente a bromoxinilo, antranilato sintasa, ariloxialcanoato dioxigenasas, acetil CoA carboxilasa, glifosato oxidorreductasa y glifosato-N-acetil transferasa.

También se incluyen en la expresión "marcadores seleccionables" genes que codifican un marcador secretable cuya secreción puede detectarse como un medio para identificar o seleccionar células transformadas. Los ejemplos incluyen marcadores que codifican un antígeno secretable que se puede identificar por la interacción de anticuerpos o incluso enzimas secretables que pueden detectarse catalíticamente. Las proteínas marcadoras secretadas seleccionables se encuentran en varias clases, incluyendo proteínas difusibles pequeñas que se pueden detectar, (por ejemplo, mediante ELISA), enzimas pequeñas activas que son detectables en solución extracelular (por ejemplo, alfa-amilasa, beta-lactamasa, fosfinotricina transferasa, o proteínas que se insertan o atrapan en la pared celular (como las proteínas que incluyen una secuencia líder, como la que se encuentra en la unidad de expresión de la extensión o las proteínas relacionadas con la patogénesis del tabaco, también conocidas como PR-S de tabaco).

Transformación celular

La invención también está dirigida a un procedimiento para producir células y plantas transformadas que comprenden un promotor unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible.

El término "transformación" se refiere a la introducción de ácido nucleico en un hospedador receptor. Tal como se usa en el presente documento, el término "hospedador" se refiere a bacterias, hongos o plantas, incluyendo cualquier célula, tejido, órgano o descendencia de las bacterias, hongos o plantas. Los tejidos y células vegetales de particular interés incluyen protoplastos, callos, raíces, tubérculos, semillas, tallos, hojas, plántulas, embriones y polen.

Tal como se usa en el presente documento, el término "transformado" se refiere a una célula, tejido, órgano u organismo en el que una molécula de polinucleótido extraña, tal como una construcción, ha sido introducida. La molécula de polinucleótido introducida puede integrarse en el ADN genómico de la célula receptora, tejido, órgano, u organismo de tal forma que la molécula de polinucleótido introducida es heredada por una progenie posterior. Un célula u organismo "transgénico" o "transformado" incluye también la descendencia de la célula u organismo y descendencia producida a partir de un programa de cultivo que emplea dicho organismo transgénico como un precursor en un cruce y que presenta un fenotipo alterado resultante de la presencia de una molécula de polinucleótido extraña. El término "transgénico" se refiere a una bacteria, hongo, o planta que contiene una o más moléculas heterólogas de ácido polinucleico.

Existen muchos procedimientos para introducir moléculas de ácido polinucleico en células vegetales. El procedimiento comprende en general las etapas de seleccionar una célula hospedadora adecuada, transformar la célula hospedadora con un vector recombinante y obtener la célula hospedadora transformada. Los procedimientos adecuados incluyen la infección bacteriana (por ejemplo *Agrobacterium*), vectores binarios de cromosomas artificiales bacterianos, administración directa de ADN (por ejemplo, mediante transformación mediada por PEG, captación de ADN mediada por desecación/inhibición, electroporación, agitación con fibras de carburo de silicio, y aceleración de partículas recubiertas de ADN, *etc.* (revisado en Potrykus, y col., Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 205 (1991)).

La tecnología de introducción de una molécula de ADN en las células es bien conocida por los expertos en la materia. Los procedimientos y materiales para transformar células vegetales mediante la introducción de una construcción de ADN vegetal en un genoma de planta en la práctica de la presente invención pueden incluir cualquiera de los procedimientos bien conocidos y demostrados que incluyen:

(1) procedimientos químicos (Graham y Van der Eb, Virology 54: 536-539 (1973) y Zatloukal, y col., Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 136-153 (1992));

(2) procedimientos físicos como la microinyección (Capecchi, Cell 22: 479-488 (1980)), electroporación (Wong y Neumann, Biochim. Biophys. Res. Commun., 107:584 -587 (1982); Fromm, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824-5828 (1985); patente de Estados Unidos n.º 5.384.253), aceleración de partículas (Johnston y Tang, Methods Cell Biol. 43(A):353-365 (1994); Fynan, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11478-11482 (1993)): y el bombardeo con microproyectiles (como se ilustra en las patentes de Estados Unidos números 5.015.580;

5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861; y 6.403.865);
(3) vectores víricos (Clapp, Clin. Perinatol. 20:155 -168 (1993); Lu, y col., J. Exp. Med. 178:2089 -2096 (1993); Eglitis y Anderson, Biotechniques 6:608-614 (1988));
(4) mecanismos mediados por receptores (Curiel y col., Hum. Gen. Ther. 3: 147-154 (1992) y Wagner, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6099-6103 (1992);
(5) mecanismos mediados por bacterias tales como transformación *mediada por Agrobacterium* (como se ilustra en las patentes de Estados Unidos números 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840; y 6.384.301);
(6) introducción directa en el polen por inyección en los órganos reproductivos de una planta (Zhou, y col., Methods in Enzymology 101:433, (1983); Hess, Interno Rev. Cytol. 107:367 (1987); Luo, y col., Planta Mol Biol. Reporter 6: 165 (1988); Pena, y col., Nature 325:274 (1987));
(7) transformación de protoplastos (como se ilustra en la patente de Estados Unidos n.º 5.508.184); y
(8) inyección en embriones inmaduros (Neuhaus, y col., Theor. Appl. Genet. 75:30 (1987)).

Cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente puede utilizarse para transformar una célula hospedadora con uno o más promotores y/o construcciones de la presente memoria. Las células hospedadoras pueden ser cualquier célula u organismo tal como una célula vegetal, célula de algas, algas, célula fúngica, hongos, célula bacteriana o célula de insecto. Las células hospedadoras y transformadas preferidas incluyen células de: plantas, *Aspergillus,* levaduras, insectos, bacterias y algas.

Los procedimientos para transformar plantas dicotiledóneas, principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y la obtención de plantas transgénicas se han publicado para el algodón (patentes de Estados Unidos números. 5.004.863; 5.159.135; y 5.518.908); soja (patentes de Estados Unidos números 5.569.834 y 5.416.011; véase también, McCabe, y col., Biotechnolgy 6: 923 (1988) y Christou y col., Plant Physiol. 87:671-674 (1988)); *Brassica* (patente de Estados Unidos n.º 5.463.174); cacahuete (Cheng y col., Plant Cell Rep. 15:653-657 (1996) y McKently y col., Plant Cell Rep. 14:699-703 (1995)); papaya; y guisante (Grant y col., Plant Cell Rep. 15:254-258 (1995)).

Se han notificado también transformaciones de plantas monocotiledóneas utilizando electroporación, bombardeo de partículas, y *Agrobacterium*. Se ha logrado la transformación y regeneración de plantas en espárragos (Bytebier, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:5354 (1987); cebada (Wan y Lemaux, Plant Physiol. 104:37 (1994)); maíz (Rhodes, y col., Science 240:204 (1988), Gordon-Kamm, y col., Plant Cell 2:603-618 (1990), Fromm, y col., Bio/Technology, 8:833 (1990), Koziel y col., Bio/Technology 11:194 (1993), y Armstrong, y col., Crop Science 35:550-557 (1995)); avena (Somers, y col., Bio/Technology 10:1589 (1992)); hierba cana (Horn, y col., Plant Cell Rep. 7:469 (1988)); centeno (De la Pena, y col., Nature, 325:274 (1987)); caña de azúcar (Bower and Birch, Plant Journal 2: 409 (1992)); festuca alta (Wang, y col., Bio/Technology 10:691 (1992)); y trigo (Vasil, y col., Bio/Technology 10:667 (1992) y patente de Estados Unidos n.º 5.631.152).

La regeneración, desarrollo y cultivo de plantas a partir de protoplastos o explantes de plantas transformadas es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego, CA (1988) y Horsch y col., Science 227:1229-1231 (1985)). Las células transformadas se cultivan generalmente en presencia de un medio selectivo, que selecciona las células transformadas con éxito e induce la regeneración de brotes y raíces de plantas en plantas intactas (Fraley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 4803 (1983)). Las plantas transformadas se obtienen típicamente en dos a cuatro meses.

Las plantas transgénicas regeneradas se autopolinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. Como alternativa, el polen obtenido de las plantas transgénicas regeneradas puede cruzarse con plantas no transgénicas, preferentemente líneas endógamas de especies agronómicamente importantes. Pueden encontrarse descripciones de los procedimientos reproductivos que se usan habitualmente para los diferentes rasgos y cultivos en uno de varios libros de referencia, véase, por ejemplo, Allard, Principles of Plant Breeding, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, Principles of crop improvement, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep y Hendriksen, Plant breeding perspectives, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, Soybeans: Improvement, Production and Uses, 2ª Edición, Monografía, 16:249 (1987); Fehr, Principles of variety development, Theory and Technique, (Vol. 1) and Crop Species Soybean (Vol 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987). Por el contrario, se puede usar polen de plantas no transgénicas para polinizar las plantas transgénicas regeneradas.

Las plantas transformadas pueden analizarse para determinar la presencia de los genes de interés y el nivel de expresión y/o perfil conferido por los elementos reguladores de la presente invención. Los expertos en la materia conocen los numerosos procedimientos disponibles para el análisis de las plantas transformadas. Por ejemplo, los procedimientos para el análisis de plantas incluyen, pero no se limitan a transferencias Southern o transferencias Northern, estrategias basadas en la PCR, análisis bioquímicos, procedimientos de cribado fenotípico, evaluaciones de campo y ensayos inmunodiagnósticos. La expresión de una molécula de polinucleótido transcribible se puede medir utilizando reactivos TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los procedimientos descritos por el fabricante y los tiempos de ciclo de PCR determinados utilizando la matriz de pruebas TaqMan®. Como alternativa, los reactivos Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) y los procedimientos descritos por el fabricante pueden utilizarse para evaluar la expresión transgénica.

Se pueden cosechar las semillas de las plantas de la presente invención a partir de plantas transgénicas fértiles y usarse para hacer crecer generaciones descendientes de plantas transformadas de la presente invención incluyendo líneas de plantas híbridas que comprenden la construcción de la presente invención y que expresan un gen de interés agronómico.

La presente invención también proporciona partes de las plantas de la presente invención. Las partes de plantas, sin limitación, incluyen hojas, tallos, raíces, tubérculos, semillas, endospermo, óvulos y polen. La invención también incluye y proporciona células vegetales transformadas que comprenden una molécula de ácido nucleico de la presente invención.

La planta transgénica puede transmitir la molécula de polinucleótido transgénico a su descendencia. La descendencia incluye cualquier parte de planta o semilla regenerable que comprenda el transgén de una planta antecesora. La planta transgénica es preferentemente homocigótica para la molécula de polinucleótido transformada y trasmite esa secuencia a todos los descendientes como resultado de la reproducción sexual. La descendencia puede crecer a partir de semillas producidas por la planta transgénica. Estas plantas adicionales pueden a continuación autopolinizarse para generar una verdadera línea de cultivo de plantas. Se evaluó la descendencia de estas plantas, entre otras cosas, para la expresión génica. Se puede detectar la expresión génica mediante varios procedimientos comunes tales como la transferencia Western, transferencia Northern, inmunoprecipitación y ELISA.

Habiendo ahora descrito de forma general la invención, esta puede entenderse más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos. Los ejemplos no incluidos en el ámbito de las reivindicaciones tienen fines ilustrativos.

Ejemplos

Se aislaron elementos reguladores útiles para dirigir la expresión de un polinucleótido transcribible en plantas transgénicas, y se analizó el patrón de expresión de estos elementos reguladores unidos operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible en plantas de soja transgénicas.

Ejemplo 1: Identificación y clonación de elementos reguladores novedosos: Promotores, líderes e intrones.

Los elementos reguladores fueron identificados y aislados del ADN genómico de una especie de monocotiledónea, el panizo común *(Setaria italica* (L.) Beauv). Se usaron secuencias genómicas patentadas y EST y secuencias genómicas públicas y EST para diseñar los cebadores, que luego se usaron con bibliotecas GenomeWalker ™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 5' de la secuencia de ADN genómica correspondiente. En el caso de promotores líderes e intrones, esta región clonada comprendía el regulador de la transcripción en 5', 5' UTR y si está presente, la secuencia de intrones en la dirección 5' de la región codificadora de proteínas para cada gen de *S. italica.* Utilizando esta secuencia, los elementos reguladores se identificaron bioinformáticamente dentro de la región 5' de cada gen. Se utilizó el análisis bioinformático para identificar el sitio de inicio de la transcripción (SST) y cualquier bidireccionalidad, intrones o secuencia codificante en dirección 5' presente en la secuencia. Utilizando los resultados de este análisis, los elementos reguladores se definieron dentro de la secuencia 5' en dirección 5' de la secuencia de codificación del gen. A continuación se diseñaron cebadores para amplificar los elementos reguladores. Se amplificó la molécula de ADN correspondiente a cada elemento regulador utilizando condiciones convencionales de la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores que contienen sitios de enzimas de restricción únicos y ADN genómico aislado de *S. italica.* Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron en un vector de expresión en plantas básico usando digestión con enzimas de restricción convencionales de sitios de restricción compatibles y procedimientos de ligadura del ADN.

Las secuencias de elementos reguladores, elementos que codifican el péptido de tránsito y las secuencias de proteínas del péptido de tránsito identificadas a partir de *S. italica* se enumeran en la Tabla 1 a continuación. Las secuencias de los elementos reguladores identificados a partir de *S. italica* se proporcionan en el presente documento como las SEQ ID NOS: 1 a 276, SEQ ID NOS: 317 a 323 y 352 a 924. Se proporcionen en el presente documento grupos de elementos reguladores de la transcripción (EXP) compuestos por un promotor, líder e intrón unidos operativamente o un promotor, líder, intrón y líder unidos operativamente como SEQ ID NOS: 1 a 22. Las secuencias promotoras se proporcionan en el presente documento como las SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536. Las secuencias líder se proporcionan en el presente documento como las SEQ ID NOS: 106 a 171 y las SEQ ID NOS: 537 a 588. Las secuencias de intrones se proporcionan como las SEQ ID NOS: 172 a 267, SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778. Las secuencias que comprenden 3' UTR se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NOS: 268 a 276 y SEQ ID NOS: 779 a 924. Las secuencias que codifican los péptidos de tránsito se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NOS: 277 a 316. El ADN genómico que codifica algunos de los péptidos de tránsito también está compuesto por intrones presentados como SEQ ID NOS: 317 a 323. Las secuencias de proteínas peptídicas de tránsito se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NOS: 324 a 350. Se proporciona un elemento potenciador como SEQ ID NO: 352.

Tabla 1. Elementos reguladores y promotores correspondientes, líderes e intrones; y secuencias de tránsito (localización).

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt	1	Cafeoil CoA metiltransferasa mejorada
EXP-FMV.35S-SETit.Gst: a	2	Glutatión S-transferasa mejorada
EXP-FMV.35S-SETit.Gst: b	3	Glutatión S-transferasa mejorada
EXP-FMV.35S-SETit.Ifr	4	Isoflavona reductasa mejorada
EXP-FMV.35S-SETit.Pox	5	Peroxidasa mejorada
EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3: a	6	Proteína de transferencia de lípidos mejorada-RCc3
EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3: b	7	Proteína de transferencia de lípidos mejorada-RCc3
EXP-FMV.35S-SETit.Tip	8	Proteína intrínseca Tonoplast mejorada
EXP-SETit.Act8:1:1	9	Actina 8
EXP-SETit.Act8:1:2	10	Actina 8
EXP-SETit.Act8:c	11	Actina 8-1
EXP-SETit.CLUS 120796-1	12	Grupo 120796-1
EXP-SETit.CLUS 19108	13	Grupo 19108
EXP-SETit.Ppdk:1:1	14	Piruvato ortofosfato diquinasa
EXP-SETit.TubA2:1:1	15	Tubulina A2
EXP-SETit.TubA2:1:3	16	Tubulina A2
EXP-SETit.TubA2-1:1:2	17	Tubulina A2-1
EXP-SETit.TubA2-2:1:1	18	Tubulina A2-2
EXP-SETit.TubA3:1:3	19	Tubulina A3
EXP-SETit.Ubq 1:1:1	20	Ubiquitina 1
EXP-SETit.Ubq 1:1:3	21	Ubiquitina 1
EXP-SETit.Ubq5	22	Ubiquitina 5
P-SETit.25509-1:1:3	23	Grupo 25509
P-SETit.Act8-1:1:5	24	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:6	25	Actina 8
P-SETit.Act8-1-1:1:2	26	Actina 8-1
P-SETit.Aip-1:1:1	27	Proteína inducida por auxina
P-SETit.Alc1-1:1:1	28	Alfa-coixina
P-SETit.Alc1-1:1:2	29	Alfa-coixina
P-SETit.Alc2-1:1:2	30	Alfa-coixina
P-SETit.Ali1-1:1:3	31	Proteína inducida por aluminio
P-SETit.Cab1-1:1:1	32	Proteína-1 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Cab3-1:1:3	33	Proteína-3 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Cbl7-1:1:1	34	Proteína análoga a calcineurina B
P-SETit.Ccoamt-1:1:2	35	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit.Cda-1:1:1	36	Proteína asociada a la muerte celular
P-SETit.CLUS 1164825-1-1:1:1	37	Grupo 1164825-1
P-SETit.CLUS1165324-1:1:1	38	Grupo 1165324-1
P-SETit.CLUS 120796-1-1:1:1	39	Grupo 120796-1
P-SETit.CLUS 19108-1:1:2	40	Grupo 19108
P-SETit.CLUS882664-1-1:1:2	41	Grupo 882664-1
P-SETit.CP29-1:1:4	42	Proteína-29 de cloroplasto
P-SETit.Cyp-1-1:1:1	43	Cisteína proteasa-1
P-SETit.Cyp78a-1:1:2	44	Cisteína proteasa-78a
P-SETit.Cys-1:1:2	45	Cisteína sintasa
P-SETit.Cys-1:1:3	46	Cisteína sintasa

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.Dzs-1:1:4	47	Proteína delta de almacenamiento de zeína
P-SETit.Dzs-1:1:5	48	Proteína delta de almacenamiento de zeína
P-SETit.Eie-1:1:1	49	Factor de alargamiento
P-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:2	50	Grupo 675389-2
P-SETit.Fba-1:1:1	51	Fructosa-bisfosfato aldolasa
P-SETit.FM54-1:1:2	52	Grupo 1102871_1
P-SETit.FM63-1:1:2	53	Grupo 1019870_1
P-SETit.Fst-1:1:1	54	Flavonol 4-sulfotransferasa
P-SETit.Gapdh2-1:1:3	55	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Grcw2-1:1:1	56	Proteína estructural 2 de la pared celular rica en glicina
P-SETit.Grf-1:1:2	57	Presunto factor de regulación del crecimiento
P-SETit.Gst-1:1:1	58	Glutatión S-transferasa
P-SETit.Gst-1:1:2	59	Glutatión S-transferasa
P-SETit.Ifr-1:1:2	60	Isoflavona reductasa
P-SETit.Ifr-1:1:3	61	Isoflavona reductasa
P-SETit.LaDo-1:1:2	62	Leucoantocianidin dioxigenasa
P-SETit.Mt1-1:1:2	63	Proteína 1 análoga a metalotioneína
P-SETit.Nrt2-1:1:2	64	Proteína análoga al transportador de nitrato
P-SETit.Nrt2-1:1:3	65	Proteína análoga al transportador de nitrato
P-SETit.OMT2.1-1:1:2	66	O-metiltransferasa-2.1
P-SETit.OMT2.2-1:1:2	67	O-metiltransferasa- 2.2
P-SETit.OMT2.3-1:1:1	68	O-metiltransferasa- 2.3
P-SETit.Omt3-1:1:3	69	O-metiltransferasa- 3
P-SETit.Omt4_2-1:1:2	70	O-metiltransferasa-4.2
P-SETit.Pip2-1:1:3	71	Acuaporina
P-SETit.Pip2-3-1:1:1	72	Acuaporina
P-SETit.Pox-1:1:1	73	Peroxidasa 1
P-SETit.Ppc-1:1:3	74	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppc-1:1:4	75	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppdk-1:1:1	76	Piruvato ortofosfato diquinasa
P-SETit.Pro1-1:1:2	77	Prolamina
P-SETit.Pro2-1:1:3	78	Prolamina
P-SETit.Prx-1:1:1	79	Peroxidasa
P-SETit.Prx17-1:1:2	80	Peroxidasa -17
P-SETit.Prx2-1:1:3	81	Peroxidasa -2
P-SETit.Prx3-1:1:3	82	Peroxidasa -3
P-SETit.Prx3-1:1:4	83	Peroxidasa- 3
P-SETit.Prx47-1:1:2	84	Peroxidasa -47
P-SETit.Prx72-1:1:2	85	Peroxidasa -72
P-SETit.PSI-4a-1:1:1	86	Fotosistema 1 4a
P-SETit.Rbcs-1:1:1	87	Subunidad pequeña RUBISCO
P-SETit.Rcc3-1:1:1	88	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:10	89	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:11	90	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:16	91	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Srp-1:1:2	92	Proteína sensible al estrés

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.Ssp1-1:1:1	93	Proteína de almacenamiento de semillas
P-SETit.Ssp1-1:1:2	94	Proteína de almacenamiento de semillas
P-SETit.Tga6-1:1:2	95	Arquitectura de la cola de teosinte
P-SETit.Tip-1:1:1	96	Proteína Tonoplast intrínseca
P-SETit.Tip-1:1:4	97	Proteína Tonoplast intrínseca
P-SETit.TubA2-1-1:1:2	98	Tubulina A2-1
P-SETit.TubA2-1-1:1:3	99	Tubulina A2-1
P-SETit.TubA2-2-1:1:3	100	Tubulina A2-2
P-SETit.TubA3-1:1:3	101	Tubulina A3
P-SETit.Ubq 1-1:1:1	102	Ubiquitina 1
P-SETit.Ubq1-1:1:3	103	Ubiquitina 1
P-SETit.Ubq5-1:1:2	104	Ubiquitina 5
P-SETit.Ucc1-1:1:2	105	Uclacianina
L-SETit.Act8-1:1:2	106	Actina 8
L-SETit.Act8-1:1:3	107	Actina 8
L-SETit.Act8-1:1:4	108	Actina 8-1
L-SETit.Aip-1:1:1	109	Proteína inducida por auxina
L-SETit.Alc1-1:1:1	110	Alfa-coixina
L-SETit.Alc2-1:1:1	111	Alfa-coixina
L-SETit.Ali1-1:1:1	112	Proteína inducida por aluminio
L-SETit.Cab1-1:1:1	113	Proteína-1 de unión a clorofila a/b
L-SETit.Cab3-1:1:1	114	Proteína-3 de unión a clorofila a/b
L-SETit.Cbl7-1:1:1	115	Proteína análoga a calcineurina B
L-SETit.Ccoamt-1:1:2	116	Cafeoil CoA metiltransferasa
L-SETit.Cda-1:1:1	117	Proteína asociada a la muerte celular
L-SETit.CLUS 1164825-1-1:1:1	118	Grupo 1164825-1
L-SETit.CLUS 120796-1-1:1:1	119	Grupo 120796-1
L-SETit.CLUS 120796-1-1:1:2	120	Grupo 120796-1
L-SETit.CLUS19108-1:1:1	121	Grupo 19108
L-SETit.CLUS19108-1:1:2	122	Grupo 19108
L-SETit.CLUS882664-1-1:1:1	123	Grupo 882664-1
L-SETit.CP29-1:1:1	124	Proteína-29 de cloroplasto
L-SETit.Cyp-1-1:1:1	125	Cisteína proteasa-1
L-SETit.Cyp78a-1:1:1	126	Cisteína proteasa-78a
L-SETit.Cys-1:1:1	127	Cisteína sintasa
L-SETit.Dzs-1:1:1	128	Proteína delta de almacenamiento de zeína
L-SETit.Eie-1:1:1	129	Factor de alargamiento
L-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:1	130	Grupo 675389-2
L-SETit.Fba-1:1:1	131	Fructosa-bisfosfato aldolasa
L-SETit.Fst-1:1:1	132	Flavonol 4-sulfotransferasa
L-SETit.Gapdh2-1:1:1	133	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
L-SETit.Grcw2-1:1:1	134	Proteína estructural 2 de la pared celular rica en glicina
L-SETit.Gst-1:1:1	135	Glutatión S-transferasa
L-SETit.Ifr-1:1:1	136	Isoflavona reductasa
L-SETit.LaDo-1:1:1	137	Leucoantocianidin dioxigenasa
L-SETit.Mt1-1:1:1	138	Proteína 1 análoga a metalotioneína
L-SETit.Nrt2-1:1:2	139	Proteína análoga al transportador de nitrato

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
L-SETit.OMT2.1-1:1:1	140	O-metiltransferasa-2.1
L-SETit.OMT2.2-1:1:1	141	O-metiltransferasa- 2.2
L-SETit.OMT2.2-1:1:2	142	O-metiltransferasa- 2.3
L-SETit.Omt3-1:1:1	143	O-metiltransferasa- 3
L-SETit.Omt4_2-1:1:1	144	O-metiltransferasa-4.2
L-SETit.Pip2-1:1:1	145	Acuaporina
L-SETit.Pip2-3-1:1:1	146	Acuaporina
L-SETit.Pox-1:1:1	147	Peroxidasa 1
L-SETit.Ppc-1:1:1	148	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
L-SETit.Ppdk-1:1:2	149	Piruvato ortofosfato diquinasa
L-SETit.Ppdk-1:1:4	150	Piruvato ortofosfato diquinasa
L-SETit.Pro1-1:1:1	151	Prolamina
L-SETit.Pro2-1:1:2	152	Prolamina
L-SETit.Prx-1:1:1	153	Peroxidasa
L-SETit.Prx 17-1:1:1	154	Peroxidasa -17
L-SETit.Prx2-1:1:2	155	Peroxidasa -2
L-SETit.Prx3-1:1:1	156	Peroxidasa -3
L-SETit.Prx47-1:1:1	157	Peroxidasa -47
L-SETit.Prx72-1:1:1	158	Peroxidasa -72
L-SETit.PSI-4a-1:1:1	159	Fotosistema 1 4a
L-SETit.Rbcs-1:1:1	160	Subunidad pequeña RUBISCO
L-SETit.Rcc3-1:1:1	161	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
L-SETit.Rcc3-1:1:2	162	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
L-SETit.Srp-1:1:1	163	Proteína sensible al estrés
L-SETit.Ssp1-1:1:1	164	Proteína de almacenamiento de semillas
L-SETit.Tip-1:1:1	165	Proteína Tonoplast intrínseca
L-SETit.TubA2-1-1:1:1	166	Tubulina A2-1
L-SETit.TubA2-2-1:1:1	167	Tubulina A2-2
L-SETit.TubA3-1:1:1	168	Tubulina A3
L-SETit.Ubq 1-1:1:1	169	Ubiquitina 1
L-SETit.Ubq5-1:1:1	170	Ubiquitina 5
L-SETit.Ucc 1-1:1:1	171	Uclacianina
I-SETit.Act8-1:1:2	172	Actina 8
I-SETit.CLUS 120796-1-1:1:1	173	Grupo 120796-1
I-SETit.CLUS19108-1:1:1	174	Grupo 19108
I-SETit.Ppdk-1:1:1	175	Piruvato ortofosfato diquinasa
I-SETit.TubA2_1-1:1:2	176	Tubulina A2-1
I-SETit.Ubq 1-1:1:1	177	Ubiquitina 1
I-SETit.Ubq5-1:1:2	178	Ubiquitina 5
I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1	179	Proteína A análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2	180	Proteína A análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3A-4-1:1:2	181	Proteína A análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3A-5-1:1:2	182	Proteína A análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1	183	Proteína B análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2	184	Proteína B análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-4-1:1:2	185	Proteína B análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-5-1:1:2	186	Proteína B análoga a 14-3-3

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.14-3-3C-1-1:1:1	187	Proteína C análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-2-1:1:1	188	Proteína C análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2	189	Proteína C análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-4-1:1:2	190	Proteína C análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2	191	Proteína C análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-1-1:1:2	192	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1	193	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2	194	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3D-4-1:1:3	195	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3D-5-1:1:2	196	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3E-2-1:1:1	197	14-3-3-como la proteína E
I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2	198	14-3-3-como la proteína E
I-SETit.14-3-3E-4-1:1:2	199	14-3-3-como la proteína E
I-SETit.14-3-3E-5-1:1:2	200	14-3-3-como la proteína E
I-SETit.40S-7S-1_1-1:2	201	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:2	202	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2	203	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:2	204	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-2_2-1:1:1	205	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-2_3-1:1:1	206	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-2_4-1:1:1	207	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:2	208	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:2	209	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:2	210	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.60S_L10A1-1-1:1:2	211	60S (proteína ribosómica L10A1)
I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2	212	60S (proteína ribosómica L10A1)
I-SETit.60S_L10A1-3-1:1:2	213	60S (proteína ribosómica L10A1)
I-SETit.60S_L10A1-4-1:1:1	214	60S (proteína ribosómica L10A1)
I-SFTit.60S_L10A1-5-1:1:2	215	60S (proteína ribosómica L10A1)
I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216	Antranilato sintasa subunidad alfa 2
I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217	Subunidad de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP
I-SETit.DnaJ_1-1:1:2	218	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219	Proteína de choque térmico
I-SETit.eEF1 g_1-1:1:2	220	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.eEF1 g_4-1:1:3	221	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1	222	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-2-1:1:2	223	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232	Factor de alargamiento 5 alfa

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.GAD_1-1:1:2	237	Decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico
I-SETit.GAD_2-1:1:2	238	Decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico
I-SETit.GAD_3-1:1:2	239	Decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico
I-SETit.GAD_4-1:1:2	240	Decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico
I-SETit.Grf1-3-1:1:1	241	Presunto factor de regulación del crecimiento
I-SETit.GRP-1-1:1:1	242	Proteína de unión a ARN rica en glicina
I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243	Proteína LSm8 análoga a Sm asociada a U6 snARN
I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244	Proteína LSm8 análoga a Sm asociada a U6 snARN
I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245	Proteína LSm8 análoga a Sm asociada a U6 snARN
I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246	Proteína LSm8 análoga a Sm asociada a U6 snARN
I-SETit.PGK3_1-1:1:2	247	Fosfoglicerato quinasa
I-SETit.PGK3_2-1:1:1	248	Fosfoglicerato quinasa
I-SETit.PIP1_1_2-1:1:1	249	Aguaporina
I-SETit.PIP1-1_1-1:1:1	250	Aguaporina
I-SETit.PIP1-1_3-1:1:2	251	Aguaporina
I-SETit.PIP1-4_3-1:1:2	252	Aguaporina
I-SETit.PIP2-2_2-1:1:2	253	Aguaporina
I-SETit.PIP2-2_3-1:1:2	254	Aguaporina
I-SETit.PIP2-5_2-1:1:2	255	Aguaporina
I-SETit.PIP2-5_3-1:1:2	256	Aguaporina
I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257	Peroxidasa 17
I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258	Peroxidasa 3
I-SETit.SBD-1-1:1:2	259	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.SBD-2-1:1:1	260	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.SBD-3-1:1:2	261	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.TubA2_1-1:1:1	262	Tubulina A2
I-SETit.TubA2_2-1:1:1	263	Tubulina A2
I-SETit.TubA2_3-1:1:1	264	Tubulina A2
I-SETit.TubA3_1-1:1:1	265	Tubulina A3
I-SETit.TubA3_2-1:1:1	266	Tubulina A3
I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267	Almidón sintasa unida a presunto granulado
T-SETit.Act1-1:1:1	268	Actina 1
T-SETit.Act8-1:1:1	269	Actina 8
T-SETit.Ams 1-1:1:1	270	S-adenosilmetionina sintetasa 1
T-SETit.Ctpt-1:1:2	271	Triosa fosfato/fosfato translocador, precursor de cloroplasto
T-SETit.Fba-1:1:1	272	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fnr-1:1:1	273	Ferredoxin-NADP+ reductasa
T-SETit.Mes2-1:1:1	274	Metionina sintasa 2
T-SETit.Ntr-1:1:1	275	Transportador de nitrito
T-SETit.Sus2-1:1:1	276	Sacarosa sintasa 2
GOI-TS-APX	277	Ascorbato peroxidasa
GOI-TS-APX:1:2	278	Ascorbato peroxidasa
GOI-TS-APX2:1:1	279	Ascorbato peroxidasa

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
GOI-TS-CNT:1:2	280	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
GOI-TS-DHDPS:1:2	281	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, cloroplástico
GOI-TS-Fe-SD:1:1	282	Hierro-superoxidodismutasas, cloroplástico
GOI-TS-PPR:1:1	283	Proteína que contiene la repetición del pentatricopéptido, hipotética
TS-SETit.APG6-1:1:1	284	Caseína lítica proteinasa B3 análoga a la proteína de choque térmico
TS-SETit.APX.2.ex1-1:1:1	285	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX.ex1-1:1:1	286	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX.ex2-1:1:2	287	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX2.ex2-1:1:1	288	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX3-1:1:1	289	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.ASA2-1:1:1	290	Antranilato sintasa subunidad alfa 2
TS-SETit.CC10-1:1:1	291	subunidad de 10 Kd de la Cloroplasto chaperonina
TS-SETit.CHoR1-1:1:1	292	Regulador de la homeostasis del calcio
TS-SETit.ClpD-1:1:1	293	Subunidad de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP
TS-SETit.CNT.ex1-1:1:1	294	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
TS-SETit.CNT.ex2-1:1:2	295	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
TS-SETit.CR88-1:1:1	296	Supuesta proteína de choque térmico
TS-SETit.DHDPS.Ex1-1:1:1	297	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, cloroplástico
TS-SETit.DHDPS.Ex2-1:1:1	298	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, cloroplástico
TS-SETit.Fe-SD.ex1-1:1:1	299	Hierro-superoxidodismutasas, cloroplástico
TS-SETit.Fe-SD.ex2-1:1:1	300	Hierro-superoxidodismutasas, cloroplástico
TS-SETit.G-typA-1:1:1	301	Proteína de unión a GTP typA
TS-SETit.HDh-1:1:1	302	Hidrolasa análoga a haloácido deshalogenasa
TS-SETit.IMP-1:1:1	303	Inositol-1-monofosfatasa, hipotética, cloroplástico
TS-SETit.MDH-1:1:1	304	hipotética NAD-malato deshidrogenasa
TS-SETit.PPR.ex1-1:1:1	305	Proteína que contiene la repetición del pentatricopéptido, hipotética
TS-SETit.PPR.ex2-1:1:2	306	Proteína que contiene la repetición del pentatricopéptido, hipotética
TS-SETit.PSPR-3-1:1:1	307	Proteína 3 ribosómica 30S específica de plástido
TS-SETit.RbcS-1-1:1:1	308	Subunidad pequeña RUBISCO
TS-SETit.RbcS_2-1:1:1	309	Subunidad pequeña RUBISCO
P-SETit.RbcS_3-1:1:1	310	Subunidad pequeña RUBISCO
P-SETit.RbcS_4-1:1:1	311	Subunidad pequeña RUBISCO
TS-SETit.ShkG-1:1:1	312	precursor de la 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa
TS-SETit.SRP43-1:1:1	313	proteína de 43 kDa de la partícula de reconocimiento de la señalización, cloroplástico
TS-SETit.TDh-1:1:1	314	Treonina deshidratasa biosintética, precursora de cloroplasto
TS-SETit.ThR-1:1:1	315	Tiorredoxina
TS-SETit.Wx1-1:1:1	316	Almidón sintasa unida a presunto granulado
I-SETit.APX.2-1:1:1	317	Ascorbato peroxidasa
I-SETit.APX-1:1:1	318	Ascorbato peroxidasa
I-SETit.APX-1:1:2	319	Ascorbato peroxidasa
I-SETit.CNT.1-1:1:1	320	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
I-SETit.DHDPS_1-1:1:1	321	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, cloroplástico

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.Fe-SD-1:1:1	322	Hierro-superoxidodismutasas, cloroplástico
I-SETit.PPR-1:1:2	323	Proteína que contiene la repetición del pentatricopéptido, hipotética
TS-SETit.APG6.pep	324	Caseína lítica proteinasa B3 análoga a la proteína de choque térmico
TS-SETit.APX.2.pep	325	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX.pep	326	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.APX3.pep	327	Ascorbato peroxidasa
TS-SETit.ASA2.pep	328	Antranilato sintasa subunidad alfa 2
TS-SETit.CC10.pep	329	subunidad de 10 Kd de la Cloroplasto chaperonina
TS-SETit.CHoR1.pep	330	Regulador de la homeostasis del calcio
TS-SETit.ClpD.pep	331	Subunidad de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP
TS-SETit.CNT.pep	332	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
TS-SETit.CR88.pep	333	Supuesta proteína de choque térmico
TS-SETit.DHDPS.pep	334	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, cloroplástico
TS-SETit.Fe-SD.pep	335	Hierro-superoxidodismutasas, cloroplástico
TS-SETit.G-typA.pep	336	Proteína de unión a GTP typA
TS-SETit.HDh.pep	337	Hidrolasa análoga a haloácido deshalogenasa
TS-SETit.IMP.pep	338	Inositol-1-monofosfatasa, hipotética, cloroplástico
TS-SETit.MDH.pep	339	hipotética NAD-malato deshidrogenasa
TS-SETit.PPR.pep	340	Proteína que contiene la repetición del pentatricopéptido, hipotética
TS-SETit.PSPR-3.pep	341	Proteína 3 ribosómica 30S específica de plástido
TS-SETit.RbcS_1.pep	342	Subunidad pequeña RUBISCO
TS-SETit.RbcS_2.pep	343	Subunidad pequeña RUBISCO
TS-SETit.RbcS_3.pep	344	Subunidad pequeña RUBISCO
TS-SETit.RbcS_4.pep	345	Subunidad pequeña RUBISCO
TS-SETit.ShkG.pep	346	precursor de la 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa
TS-SETit.SRP43.pep	347	proteína de 43 kDa de la partícula de reconocimiento de la señalización, cloroplástico
TS-SETit.TDh.pep	348	Treonina deshidratasa biosintética, precursora de cloroplasto
TS-SETit.ThR.pep	349	Tiorredoxina
TS-SETit.Wx1.pep	350	Almidón sintasa unida a presunto granulado
E-FMV.35S-1:1:2	351	Potenciador FMV 35S
E-SETit.Mth-1:1:2	352	Metalotioneína
P-SETit.25509-1:1:1	353	Grupo 25509
P-SETit.25509-1:1:2	354	Grupo 25509
P-SETit.Act8-1:1:1	355	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:2	356	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:3	357	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:4	358	Actina 8
P-SETit.Act8-1:1:7	359	Actina 8
P-SETit.Act8-1-1:1:1	360	Actina 8
P-SETit.Aip-1:1:2	361	Proteína inducida por auxina
P-SETit.AKR-1:1:1	362	Aspartato quinasa reductasa
P-SETit.AKR-1:1:2	363	Aspartato quinasa reductasa
P-SETit.Alc2-1:1:1	364	Alfa-coixina

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.Ali1-1:1:1	365	Proteína inducida por aluminio
P-SETit.Ali1-1:1:2	366	Proteína inducida por aluminio
P-SETit.Ali1-1:1:4	367	Proteína inducida por aluminio
P-SETit.Cab3-1:1:1	368	Proteína 3 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Cab3-1:1:2	369	Proteína 3 de unión a clorofila a/b
P-SETit.cab6-1:1:1	370	Proteína 6 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Cab6-1:1:1	371	Proteína 6 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Cab6-1:1:2	372	Proteína 6 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Cafeoil CoA metiltransferasa-1:1:1	373	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit.Cafeoil-CoA O-metiltransferasa-1:1:1	374	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit.Cafeoil-CoA O-metiltrasnferasa-a-1:1:1	375	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit.Ccoamt-1:1:1	376	Cafeoil CoA metiltransferasa
P-SETit.Chi-1:1:1	377	Quitinasa
P-SETit.quitinasa-1:1:1	378	Quitinasa
P-SETit.Quitinasa-1:1:1	379	Quitinasa
P-SETit.Quitinasa-1:1:2	380	Quitinasa
P-SETit.Quitinasa-1:1:3	381	Quitinasa
P-SETit.Chl A/b III-1:1:1	382	Proteína 3 de unión a clorofila a/b
P-SETit.Chl a/b pre-1:1:1	383	Proteína previa de unión a Clorofila a/b
P-SETit.Citinasa de clase III-1:1:1	384	Citinasa de clase III
P-SETit.Citinasa de clase III-1:1:2	385	Citinasa de clase III
P-SETit.Citinasa de clase III-1:1:3	386	Citinasa de clase III
P-SETit.CLUS19108-1:1:1	387	Grupo 19108
P-SETit.CLUS882664-1-1:1:1	388	Grupo 882664
P-SETit.CLUS882664-1-1:1:2	389	Grupo 882664
P-SETit.Cp26-1:1:1	390	Proteína-26 de cloroplasto
P-SETit.Cp26-1:1:2	391	Proteína-26 de cloroplasto
P-SETit.CP29-1:1:1	392	Proteína-29 de cloroplasto
P-SETit.CP29-1:1:2	393	Proteína-29 de cloroplasto
P-SETit.CP29-1:1:3	394	Proteína-29 de cloroplasto
P-SETit.CP29-1:1:5	395	Proteína-29 de cloroplasto
P-SETit.Cyp78a-1:1:1	396	Cisteína proteasa-78a
P-SETit.Cys-1:1:1	397	Cisteína proteasa
P-SETit.Cys-1:1:4	398	Cisteína proteasa
P-SETit.Cys-1:1:5	399	Cisteína proteasa
P-SETit.DRP-1:1:1	400	Proteína sensible a la deshidratación
P-SETit.DRP-1:1:2	401	Proteína sensible a la deshidratación
P-SETit.DRP-B-1:1:1	402	Proteína sensible a la deshidratación
P-SETit.Dzs-1:1:1	403	Proteína delta de almacenamiento de zeína
P-SETit.Dzs-1:1:2	404	Proteína delta de almacenamiento de zeína
P-SETit.Dzs-1:1:3	405	Proteína delta de almacenamiento de zeína
P-SETit.ESTCLUS675389-2-1:1:1	406	Grupo 675389-2
P-SETit.ESTCLUS675389-2-1:1:2	407	Grupo 675389-2
P-SETit.FBP-ald-1:1:1	408	Fructosa 1,6-Bifosfato Aldolasa
P-SETit.FM54-1:1:1	409	Grupo 1102871_1

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.FM63-1:1:1	410	Grupo 1019870_1
P-SETit.foxtailRcc3-1:1:1	411	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.FStr1-1:1:1	412	Flavonol 4-sulfotransferasa
P-SETit.FStr1-1:1:2	413	Flavonol 4-sulfotransferasa
P-SETit.FStr2-1:1:1	414	Flavonol 4-sulfotransferasa
P-SETit.Gahdp-1:1:1	415	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Gahdp-1:1:2	416	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.gapdh-1:1:1	417	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Gapdh2-1:1:1	418	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Gapdh2-1:1:2	419	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
P-SETit.Glutatión S-Transferasa-1:1:1	420	Glutatión S-Transferasa
P-SETit.Glutatión S-transferasa-1:1:1	421	Glutatión S-Transferasa
P-SETit.Glutatión S-transferasa-1:1:2	422	Glutatión S-Transferasa
P-SETit.Glutatión S-transferasa-1:1:3	423	Glutatión S-Transferasa
P-SETit.Grcw2-1:1:2	424	Proteína estructural 2 de la pared celular rica en glicina
P-SETit.Grf-1:1:1	425	Presunto factor de regulación del crecimiento
P-SETit.Ifr-1:1:1	426	Isoflavona reductasa
P-SETit.Ifr2-1:1:1	427	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa análoga a 1:1:1	428	Isoflavona reductasa análoga
P-SETit.Isoflavona Reductasa análoga a 1:1:2	429	Isoflavona reductasa análoga
P-SETit.Isoflavona reductasa 2-1:1:1	430	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa análoga a 1:1:1	431	Isoflavona reductasa análoga
P-SETit.Isoflavona reductasa-1:1:1	432	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa-1:1:1	433	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona reductasa-1:1:2	434	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona Reductasa1-1:1:1	435	Isoflavona reductasa
P-SETit.Isoflavona Reductasa 1-1:1:2	436	Isoflavona reductasa
P-SETit.LaDo-1:1:1	437	Leucoantocianidin dioxigenasa
P-SETit.Mt1-1:1:1	438	Proteína 1 análoga a metalotioneína
P-SETit.Mt1-1:1:3	439	Proteína 1 análoga a metalotioneína
P-SETit.Mth-1:1:1	440	Metalotioneína
P-SETit.Mth-1:1:2	441	Metalotioneína
P-SETit.Mth-1:1:4	442	Metalotioneína
P-SETit.MTLP-1:1:1	443	Proteína análoga a la metalotioneína
P-SETit.MTLP-1:1:2	444	Proteína análoga a la metalotioneína
P-SETit.MTLP-1:1:3	445	Proteína análoga a la metalotioneína
P-SETit.Nadp-Me-1:1:1	446	Enzima malato NADP
P-SETit.Nadp-me-1:1:1	447	Enzima malato NADP
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:1	448	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:1	449	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:2	450	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:2	451	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitrito-1:1:3	452	Transportador de nitrito
P-SETit.Transportador de nitritro-1:1:3	453	Transportador de nitrito
P-SETit.Nr1-1:1:1	454	Nitrato reductasa

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.Nr1-1:1:2	455	Nitrato reductasa
P-SETit.Nr1-1:1:3	456	Nitrato reductasa
P-SETit.Nr1-1:1:4	457	Nitrato reductasa
P-SETit.Nr1-1:1:5	458	Nitrato reductasa
P-SETit.NRED-1:1:1	459	Nitrato reductasa
P-SETit.Nrt2-1:1:1	460	Proteína análoga al transportador de nitrato
P-SETit.OMT2.1-1:1:1	461	O-metiltransferasa
P-SETit.OMT2.2-1:1:1	462	O-metiltransferasa
P-SETit.Omt3-1:1:1	463	O-metiltransferasa
P-SETit.Omt3-1:1:2	464	O-metiltransferasa
P-SETitOmt4_2-1:1:1	465	O-metiltransferasa
P-SETit.OMt4-1:1:1	466	O-metiltransferasa
P-SETit.Peroxidasa-1:1:1	467	Peroxidasa
P-SETit.Peroxidasa-1:1:2	468	Peroxidasa
P-SETit.Pip2-1:1:1	469	Acuaporina
P-SETit.pip2-1:1:1	470	Acuaporina
P-SETit.Pip2-1:1:2	471	Acuaporina
P-SETit.pip2-1:1:2	472	Acuaporina
P-SETit.Pip2-3-1:1:2	473	Acuaporina
P-SETit.Pip2-3-1:1:3	474	Acuaporina
P-SETit.Pip2-3-1:1:4	475	Acuaporina
P-SETit.PIP2-5-1:1:1	476	Acuaporina
P-SETit.POX-1:1:1	477	Peroxidasa
P-SETit.Ppc-1:1:1	478	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppc-1:1:2	479	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppc-1:1:5	480	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppc-1:1:6	481	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P-SETit.Ppdk-1:1:2	482	Piruvato ortofosfato diquinasa
P-SETit.Pro1-1:1:1	483	Prolamina 1
P-SETit.Pro2-1:1:1	484	Prolamina 2
P-SETit.Pro2-1:1:2	485	Prolamina 2
P-SETit.Prx17-1:1:1	486	Peroxidasa 17
P-SETit.Prx2-1:1:1	487	Peroxidasa 2
P-SETit.Prx2-1:1:2	488	Peroxidasa 2
P-SETit.Prx2-1:1:4	489	Peroxidasa 2
P-SETit.Prx3-1:1:1	490	Peroxidasa 3
P-SETit.Prx3-1:1:2	491	Peroxidasa 3
P-SETit.Prx3-1:1:5	492	Peroxidasa 3
P-SETit.Prx4-1:1:1	493	Peroxidasa 4
P-SETit.Prx47-1:1:1	494	Peroxidasa 47
P-SETit.Prx47-1:1:3	495	Peroxidasa 47
P-SETit.Prx72-1:1:1	496	Peroxidasa 72
P-SETit.PSIRC-1:1:1	497	Centro de reacción del fotosistema 1
P-SETit.Rbcs-1:1:2	498	Subunidad pequeña RUBISCO
P-SETit.Rcc3-1:1:12	499	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:13	500	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:14	501	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
P-SETit.Rcc3-1:1:15	502	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:2	503	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:3	504	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:4	505	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:5	506	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:6	507	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:7	508	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:8	509	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.Rcc3-1:1:9	510	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
P-SETit.RUBP-1:1:1	511	RuBP-carboxilasa/oxigenasa
P-SETit.RUBP-pre-1:1:1	512	RuBP-carboxilasa/precursor de la oxigenasa
P-SETit.Srp-1:1:1	513	Proteína sensible al estrés
P-SETit.Srp-1:1:3	514	Proteína sensible al estrés
P-SETit.Tga6-1:1:1	515	Arquitectura de la cola de teosinte
P-SETit.TGA6-1:1:1	516	Arquitectura de la cola de teosinte
P-SETit.TGA6-1:1:2	517	Arquitectura de la cola de teosinte
P-SETit.TIP-1:1:1	518	Proteína Tonoplast intrínseca
P-SETit.Tip-1:1:2	519	Proteína Tonoplast intrínseca
P-SETit.Tip-1:1:3	520	Proteína Tonoplast intrínseca
P-SETit.Tip-1:1:5	521	Proteína Tonoplast intrínseca
P-SETit.Tip-1:1:6	522	Proteína Tonoplast intrínseca
P-SETit.Tub3A-1:1:1	523	Tubulina A3
P-SETit.TubA-1:1:1	524	Tubulina A
P-SETit.TubA-1:1:2	525	Tubulina A
P-SETit.TubA2-1-1:1:1	526	Tubulina A2
P-SETit.TubA2-1-1:1:4	527	Tubulina A2
P-SETit.TubA2-2-1:1:1	528	Tubulina A2
P-SETit.TubA2-2-1:1:2	529	Tubulina A2
P-SETit.TubA3-1:1:1	530	Tubulina A3
P-SETit.TubA3-1:1:2	531	Tubulina A3
P-SETit.Ubq 1-1:1:2	532	Ubiquitina 1
P-SETit.Ubq5-1:1:1	533	Ubiquitina 5
P-SETit.Ucc 1-1:1:1	534	Uclacianina
P-SETit.Ucc1-1:1:3	535	Uclacianina
P-SETit.Ucc2-1:1:1	536	Uclacianina
L-SETit.25509-1:1:1	537	Grupo 25509
L-SETit.Act1-1:1:1	538	Actina 1
L-SETit.Act2-1:1:1	539	Actina 2
L-SETit.Act8-1:1:1	540	Actina 8
L-SETit.Actina-1:1:1	541	Actina
L-SETit.AKR-1:1:1	542	Aspartato quinasa reductasa
L-SETit.Cab3-1:1:2	543	Clorofila a/b
L-SETit.Cafeoil-CoA O-metiltransferasa-1:1:1	544	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa
L-SETit.Cafeoil-CoA O-metiltrasnferasa-1:1:2	545	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa
L-SETit.Ccoamt-1:1:1	546	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
L-SETit.Chi-1:1:1	547	Quitinasa
L-SETit.CP29-1:1:2	548	Proteína-29 de cloroplasto
L-SETit.CP29-1:1:3	549	Proteína-29 de cloroplasto
L-SETit.DRP-1:1:1	550	Proteína sensible a la deshidratación
L-SETit.DRP-1:1:2	551	Proteína sensible a la deshidratación
L-SETit.FStr1-1:1:1	552	Flavonol 4-sulfotransferasa
L-SETit.FStr1-1: 1:2	553	Flavonol 4-sulfotransferasa
L-SETit.FStr1-1: 1:3	554	Flavonol 4-sulfotransferasa
L-SETit.gapdh-1:1:1	555	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
L-SETit.Gapdh-1:1:1	556	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
L-SETit.Grf-1:1:1	557	Presunto factor de regulación del crecimiento
L-SETit.Grf-1:1:2	558	Presunto factor de regulación del crecimiento
L-SETit.Isoflavona reductasa 2-1:1:1	559	Isoflavona reductasa
L-SETit.Isoflavona Reductasa 1-1:1:1	560	Isoflavona reductasa
L-SETit.MOt4-1:1:1	561	O-metiltransferasa
L-SETit.Mth-1:1:1	562	Metalotioneína
L-SETit.Mth-1:1:2	563	Metalotioneína
L-SETit.MTLP-1:1:1	564	Proteína análoga a metalotioneína
L-SETit.MTLP-1:1:2	565	Proteína análoga a metalotioneína
L-SETit.Nadp-me-1:1:1	566	Enzima malato NADP
L-SETit.NADP-Me-1:1:1	567	Enzima malato NADP
L-SETit.Nr1-1:1:1	568	Nitrato reductasa
L-SETit.Nr1-1:1:2	569	Nitrato reductasa
L-SETit.Nr1-1:1:3	570	Nitrato reductasa
L-SETit.Nrt2-1:1:1	571	Nitrato reductasa
L-SETit.OMt4-1:1:1	572	O-metiltransferasa
L-SETit.Pip2-3-1:1:2	573	Acuaporina
L-SETit.POX-1:1:1	574	Peroxidasa
L-SETit.Ppc-1:1:2	575	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
L-SETit.Ppc-1:1:3	576	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
L-SETit.Ppc-1:1:4	577	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
L-SETit.Ppdk-1:1:1	578	Piruvato ortofosfato diquinasa
L-SETit.Ppdk-1:1:3	579	Piruvato ortofosfato diquinasa
L-SETit.Pro2-1:1:1	580	Prolamina 2
L-SETit.Prx2-1:1:1	581	Peroxidasa 2
L-SETit.Prx4-1:1:1	582	Peroxidasa 4
L-SETit.Rcc3-1:1:3	583	Proteína de transferencia de lípidos-RCc3
L-SETit.TGA6-1:1:1	584	Arquitectura de la cola de teosinte
L-SETit.TIP-1:1:1	585	Proteína Tonoplast intrínseca
L-SETit.Tip-1:1:2	586	Proteína Tonoplast intrínseca
L-SETit.TubA-1:1:1	587	Tubulina A
L-SETit.TubA-1:1:2	588	Tubulina A
I-SETit.14-3-3A-3-1:1:1	589	Proteína A análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3A-4-1:1:1	590	Proteína A análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3A-5-1:1:1	591	Proteína A análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-3-1:1:1	592	Proteína B análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3B-4-1:1:1	593	Proteína B análoga a 14-3-3

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.14-3-3B-5-1:1:1	594	Proteína B análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-3-1:1:1	595	Proteína C análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-4-1:1:1	596	Proteína C análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3C-5-1:1:1	597	Proteína C análoga a 14-3-3
I-SETit.14-3-3D-1-1:1:1	598	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3D-3-1:1:1	599	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3D-4-1:1:1	600	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3D-4-1:1:2	601	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3D-5-1:1:1	602	14-3-3-como la proteína D
I-SETit.14-3-3E-3-1:1:1	603	14-3-3-como la proteína E
I-SETit.14-3-3E-4-1:1:1	604	14-3-3-como la proteína E
I-SETit.14-3-3E-5-1:1:1	605	14-3-3-como la proteína E
I-SETit.14-3-3lp-1:1:1	606	Proteína similar a 14-3-3
I-SETit.40S-7S-1_1-1:1:1	607	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:1	608	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:1	609	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:1	610	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:1	611	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:1	612	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:1	613	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.40S-7S-3_3p-1:1:1	614	40S (proteína ribosómica S7)
I-SETit.60S_L10A1-1-1:1:1	615	60S (proteína ribosómica L10A1)
I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:1	616	60S (proteína ribosómica L10A1)
I-SETit.60S_L10A1-3-1:1:1	617	60S (proteína ribosómica L10A1)
I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:1	618	60S (proteína ribosómica L10A1)
I-SETit.Act1-1:1:1	619	Actina 1
I-SETit.Act1-1:1:2	620	Actina 1
I-SETit.Act1-1:1:3	621	Actina 1
I-SETit.Act1-1:1:4	622	Actina 1
I-SETit.Act2-1:1:1	623	Actina 2
I-SETit.Act3-1:1:1	624	Actina 3
I-SETit.Act3-1:1:2	625	Actina 3
I-SETit.Act4-1:1:1	626	Actina 4
I-SETit.Act4-1:1:2	627	Actina 4
I-SETit.Act6-1:1:1	628	Actina 6
I-SETit.Act6-1:1:2	629	Actina 6
I-SETit.Act6-1:1:3	630	Actina 6
I-SETit.Act6-1:1:4	631	Actina 6
I-SETit.Act7-1:1:1	632	Actina 7
I-SETit.Act7-1:1:2	633	Actina 7
I-SETit.Act7-1:1:3	634	Actina 7
I-SETitAct8-1:1:1	635	Actina 8
I-SETit.Actin1-1:1:1	636	Actina 1
I-SETit.Arp1_1-1:1:1	637	Proteína ribosómica ácida 60S P2A, hipotética, expresado
I-SETit.Arp1_1-1:1:2	638	Proteína ribosómica ácida 60S P2A, hipotética, expresado
I-SETit.Arp1_1-1:1:3	639	Proteína ribosómica ácida 60S P2A, hipotética, expresado
I-SETit.Arp1_2-1:1:1	640	Proteína ribosómica ácida 60S P2A, hipotética, expresado

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.Arp1_2-1:1:2	641	Proteína ribosómica ácida 60S P2A, hipotética, expresado
I-SETit.Arp1_3-1:1:1	642	Proteína ribosómica ácida 60S P2A, hipotética, expresado
I-SETit.Arp1_3-1:1:2	643	Proteína ribosómica ácida 60S P2A, hipotética, expresado
I-SETit.ASA2-3-1:1:1	644	Antranilato sintasa subunidad alfa 2
I-SETit.CNT-1-1:1:1	645	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
I-SETit.CNT-2-1:1:1	646	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
I-SETit.CNT-3-1:1:1	647	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
I-SETit.Cys-1-1:1:1	648	Cisteína proteasa
1-SETit.Cys-2-1:1:1	649	Cisteína proteasa
I-SETit.Cys-3-1:1:1	650	Cisteína proteasa
I-SETit.DHDPS-1-1:1:1	651	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, cloroplástico
I-SETit.DHDPS-2-1:1:1	652	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, cloroplástico
I-SETit.DnaJ_1-1:1:1	653	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaJ2-1:1:1	654	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaJ2-1:1:2	655	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaJ3-2-1:1:1	656	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK10-1:1:1	657	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK10-1:1:2	658	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK1-1:1:1	659	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK1-1:1:2	660	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK1-1:1:3	661	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK2-1:1:1	662	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK5-1:1:1	663	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK5-1:1:2	664	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK6-1:1:1	665	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK6-1:1:2	666	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK8-1:1:1	667	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK8-1:1:2	668	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK8-1:1:3	669	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK9-1:1:1	670	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK9-1:1:2	671	Proteína de choque térmico
I-SETit.DnaK9-1-1:1:1	672	Proteína de choque térmico
I-SETit.eEF1a_1-1:1:1	673	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_1-1:1:2	674	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_2-1:1:1	675	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_2-1:1:2	676	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_3-1:1:1	677	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_3-1:1:2	678	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_4-1:1:1	679	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_4-1:1:2	680	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_5-1:1:1	681	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETiteEF1a_5-1:1:2	682	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_6-1:1:1	683	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_6-1:1:2	684	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_7-1:1:1	685	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_7-1:1:2	686	Factor de alargamiento 1 alfa
I-SETit.eEF1a_7-1:1:3	687	Factor de alargamiento 1 alfa

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.eEF1 g_1-1:1:1	688	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.eEF1 g_2-1:1:1	689	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SFTit.eEF1 g_2-1:1:2	690	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SFTit.eEF1 g_2-1:1:3	691	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.eEF1 g_3-1:1:1	692	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.eEF1 g_3-1:1:2	693	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETite.EF1 g_4-1:1:1	694	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.eFF1 g_4-1:1:2	695	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.eEF1g3-2-1:1:1	696	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.eEF1g3-3-1:1:1	697	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.eEF2-1:1:1	698	Factor de alargamiento 2
I-SETit.eEF2-1:1:2	699	Factor de alargamiento 2
I-SETit.eEF2-1:1:3	700	Factor de alargamiento 2
I-SETit.eIF5A1-2-1:1:1	701	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-3-1:1:1	702	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-4-1:1:1	703	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A1-5-1:1:1	704	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-1-1:1:1	705	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-2-1:1:1	706	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-2-1:1:2	707	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-3-1:1:1	708	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-4-1:1:1	709	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A2-5-1:1:1	710	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-2-1:1:1	711	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-3-1:1:1	712	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-4-1:1:1	713	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.eIF5A3-5-1:1:1	714	Factor de alargamiento 5 alfa
I-SETit.Ein3-1:1:1	715	Proteína de tipo 3 insensible al etileno
I-SETit.EIN3-1:1:1	716	Proteína de tipo 3 insensible al etileno
I-SETit.GAD_1-1:1:1	717	Decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico
I-SETit.GAD_2-1:1:1	718	Decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico
I-SETit.GAD_3-1:1:1	719	Decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico
I-SETit.GAD_4-1:1:1	720	Decarboxilasa del ácido UDP-glucurónico
I-SETit.Grf1-1:1:1	721	Presunto factor de regulación del crecimiento
I-SETit.Grf2-1:1:1	722	Presunto factor de regulación del crecimiento
I-SETit.Grf3-1:1:1	723	Presunto factor de regulación del crecimiento
I-SETit.Grp-1:1:1	724	Proteína de unión a ARN rica en glicina
I-SETit.HDh-1:1:1	725	Acuaporina
I-SETit.I-SETit.PIP1-1_2-1:1:1	726	Acuaporina
I-SETit.I-SETit.PIP1-1_3-1:1:1	727	Acuaporina
I-SETit.I-SETit.PIP2-2_2-1:1:1-1:1:1	728	Acuaporina
I-SETit.LSm80-1-1:1:1	729	Proteína LSm80 análoga a Sm asociada a U6 snARN
I-SETit.LSm80-2-1:1:1	730	Proteína LSm80 análoga a Sm asociada a U6 snARN
I-SETit.LSm80-3-1:1:1	731	Proteína LSm80 análoga a Sm asociada a U6 snARN
I-SETit.LSm80-4-1:1:1	732	Proteína LSm80 análoga a Sm asociada a U6 snARN
I-SETit.LSm8-1-1:1:1	733	Proteína LSm8 análoga a Sm asociada a U6 snARN
I-SETit.LSm8-4-1:1:1	734	Proteína LSm8 análoga a Sm asociada a U6 snARN

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
I-SETit.MDH-1:1:1	735	hipotética NAD-malato deshidrogenasa
I-SETit.Nab-1:1:1	736	Proteína de unión a ácido nucleico
I-SETit.NAB-1:1:1	737	Proteína de unión a ácido nucleico
I-SETit.NADP-Me-1:1:1	738	Enzima malato NADP
I-SETit.NADP-Me-1:1:2	739	Enzima malato NADP
I-SETit.PGK1-1:1:1	740	Fosfoglicerato quinasa
I-SETit.PGK1-1:1:2	741	Fosfoglicerato quinasa
I-SETit.Pgk1-1-1:1:1	742	Fosfoglicerato quinasa
I-SETit.Pgk1-2-1:1:1	743	Fosfoglicerato quinasa
I-SETit.PGK3_1-1:1:1	744	Fosfoglicerato quinasa
I-SETit.PIP1_3_2-1:1:1	745	Acuaporina
I-SETit.PIP1-1_2-1:1:1	746	Acuaporina
I-SETit.PIP1-1_3-1:1:1	747	Acuaporina
I-SETit.PIP1-3_3-1:1:1	748	Acuaporina
I-SETit.PIP1-4_3-1:1:1	749	Acuaporina
I-SETit.PIP2-2_2-1:1:1	750	Acuaporina
I-SETit.PIP2-2_3-1:1:1	751	Acuaporina
I-SETit.PIP2-5_2-1:1:1	752	Acuaporina
I-SETit.PIP2-5_3-1:1:1	753	Acuaporina
I-SETit.PPR-1:1:1	754	Proteína que contiene repetición de pentatricopéptido
I-SETit.Prx17-1-1:1:1	755	Peroxidasa 17
I-SETit.Prx3-1-1:1:1	756	Peroxidasa 3
I-SETit.Prx3-2-1:1:1	757	Peroxidasa 3
I-SETit.PSRP-3-1:1:1	758	Proteína ribosómica de plástidos y cianobacterias
I-SETit.RbcS_1-1:1:1	759	Subunidad pequeña RUBISCO
I-SETit.RbcS_2-1:1:1	760	Subunidad pequeña RUBISCO
I-SETit.RbcS_3-1:1:1	761	Subunidad pequeña RUBISCO
I-SETit.RbcS_4-1:1:1	762	Subunidad pequeña RUBISCO
I-SETit.Rps7-2_2-1:1:1	763	Proteína de la familia 40S-7S-2
I-SETit.Rps7-2_3-1:1:1	764	Proteína de la familia 40S-7S-2
I-SETit.Rps7-2_4-1:1:1	765	Proteína de la familia 40S-7S-2
I-SETit.SBD-1-1:1:1	766	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.SBD-3-1:1:1	767	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETit.SBS-2-1:1:1	768	Proteína del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
I-SETitSETit.eEF1 g_4-1:1:1	769	Factor de alargamiento 1 gamma
I-SETit.ThioR-1:1:1	770	Tiorreductasa
I-SETit.TubA2_3-1:1:2	771	Tubulina A2
I-SETit.TubA2-1:1:1	772	Tubulina A2
I-SETit.TubA2-2-1:1:1	773	Tubulina A2
I-SETit.TubA2-3-1:1:1	774	Tubulina A2
I-SETit.TubA3_1-1:1:2	775	Tubulina A3
I-SETit.TubA3_2-1:1:2	776	Tubulina A3
I-SETit.Ubq5-1:1:1	777	Ubiquitina 5
I-SETit.Wx1-1-1:1:1	778	Almidón sintasa unida a presunto granulado
T-SETit.36384-1:1:1	779	Grupo 36384
T-SETit.37025-1:1:1	780	Grupo 37025
T-SETit.37470-1:1:1	781	Grupo 37470

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
T-SETit.Ams2-1:1:1	782	S-adenosilmetionina sintetasa 2
T-SETit.Atps-1:1:1	783	Subunidad gamma de la ATP sintasa
T-SETit.Cab-1:1:1	784	Proteína de unión a clorofila a/b
T-SETit.Cab1-1:1:1	785	Proteína de unión a clorofila a/b
T-SETit.Ctpt-1:1:1	786	Triosa fosfato/fosfato translocador, precursora de cloroplasto
T-SETit.DnaK-1:1:1	787	Proteína de choque térmico
T-SETit.Fba-1:1:2	788	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fba-1:1:3	789	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fba-1:1:4	790	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Gapdh-1:1:1	791	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
T-SETit.MES2_nno-1:1:1	792	Metionina sintasa 2
T-SETit.Oep-1:1:1	793	Proteína evolutiva del oxígeno de 33kDa
T-SETit.Pea-1:1:1	794	ATPasa de exportación de protones
T-SETit.Pod-1:1:1	795	piruvato ortofosfato diquinasa
T-SETit.Ppc-1:1:1	796	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
T-SETit.Psi-K-1:1:1	797	Subunidad del centro de reacción del fotosistema I
T-SETit.Psi-L-1:1:1	798	Subunidad del centro de reacción del fotosistema I
T-SETit.Rfe-s-1:1:1	799	Rieske Fe-S
T-SETit.TubA-1:1:1	800	Tubulina A
T=contig00388	801	Raíz 3' UTR
T=contig05482	802	Raíz 3' UTR
T=contig08555	803	Raíz 3' UTR
T=contig08556	804	Raíz 3' UTR
T=contig09485	805	Raíz 3' UTR
T=contig13749	806	Raíz 3' UTR
T=contig16157	807	Raíz 3' UTR
T=contig18936	808	Raíz 3' UTR
T=contig18994	809	Raíz 3' UTR
T=contig21387	810	Raíz 3' UTR
T=contig23385	811	Raíz 3' UTR
T=contig24188	812	Raíz 3' UTR
T=contig24188	813	Raíz 3' UTR
T=contig24832	814	Raíz 3' UTR
T=contig24890	815	Raíz 3' UTR
T=contig24916	816	Raíz 3' UTR
T=contig25097	817	Raíz 3' UTR
T=contig25509	818	Raíz 3' UTR
T=contig25584	819	Raíz 3' UTR
T=contig26532	820	Raíz 3' UTR
T=contig28013	821	Raíz 3' UTR
T=contig29922	822	Raíz 3' UTR
T=contig34261	823	Raíz 3' UTR
T=contig34311	824	Raíz 3' UTR
T=contig34749	825	Raíz 3' UTR
T=contig35408	826	Raíz 3' UTR
T=contig35550	827	Raíz 3' UTR
T=contig35785	828	Raíz 3' UTR

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
T=contig35943	829	Raíz 3' UTR
T=contig36050	830	Raíz 3' UTR
T=contig36266	831	Raíz 3' UTR
T=contig36378	832	Raíz 3' UTR
T=contig36502	833	Raíz 3' UTR
T=contig36728	834	Raíz 3' UTR
T=contig36811	835	Raíz 3' UTR
T=contig36883	836	Raíz 3' UTR
T=contig37316	837	Raíz 3' UTR
T=contig37476	838	Raíz 3' UTR
T=contig37510	839	Raíz 3' UTR
T=contig37704	840	Raíz 3' UTR
T=contig37883	841	Raíz 3' UTR
T=contig37920	842	Raíz 3' UTR
T=contig37959	843	Raíz 3' UTR
T=contig37976	844	Raíz 3' UTR
T=contig38003	845	Raíz 3' UTR
T-SETIT-28JUL09-CLUS3016_12	846	Raíz 3' UTR
T-10SETIT-28JUL09-CLUS1332_4	847	3' UTR Constitutivo
T-17SETIT-28JUL09-CLUS1910_15	848	3' UTR Constitutivo
T-7SETIT-28JUL09-CLUS2844_11	849	3' UTR Constitutivo
T=contig00006	850	3' UTR Constitutivo
T=contig00142	851	3' UTR Constitutivo
T=contig00191	852	3' UTR Constitutivo
T=contig00205	853	3' UTR Constitutivo
T=contig00242	854	3' UTR Constitutivo
T=contig00263	855	3' UTR Constitutivo
T=contig01883	856	3' UTR Constitutivo
T=contig02157	857	3' UTR Constitutivo
T=contig02856	858	3' UTR Constitutivo
T=contig02883	859	3' UTR Constitutivo
T=contig04253	860	3' UTR Constitutivo
T=contig05397	861	3' UTR Constitutivo
T=contig05720	862	3' UTR Constitutivo
T=contig10626	863	3' UTR Constitutivo
T=contig10874	864	3' UTR Constitutivo
T=contig11193	865	3' UTR Constitutivo
T=contig14970	866	3' UTR Constitutivo
T=contig26892	867	3' UTR Constitutivo
T=contig32186	868	3' UTR Constitutivo
T=contig32187	869	3' UTR Constitutivo
T=contig33439	870	3' UTR Constitutivo
T=contig33682	871	3' UTR Constitutivo
T=contig34270	872	3' UTR Constitutivo
T=contig34378	873	3' UTR Constitutivo
T=contig35132	874	3' UTR Constitutivo
T=contig35270	875	3' UTR Constitutivo

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
T=contig35388	876	3' UTR Constitutivo
T=contig35412	877	3' UTR Constitutivo
T=contig35488	878	3' UTR Constitutivo
T=contig35982	879	3' UTR Constitutivo
T=contig36384	880	3' UTR Constitutivo
T=contig36588	881	3' UTR Constitutivo
T=contig36702	882	3' UTR Constitutivo
T=contig36980	883	3' UTR Constitutivo
T=contig36992	884	3' UTR Constitutivo
T=contig36993	885	3' UTR Constitutivo
T=contig37025	886	3' UTR Constitutivo
T=contig37162	887	3' UTR Constitutivo
T=contig37351	888	3' UTR Constitutivo
T=contig37386	889	3' UTR Constitutivo
T=contig37448	890	3' UTR Constitutivo
T=contig37456	891	3' UTR Constitutivo
T=contig37638	892	3' UTR Constitutivo
T=contig37732	893	3' UTR Constitutivo
T=contig37897	894	3' UTR Constitutivo
T=contig37927	895	3' UTR Constitutivo
T=contig37962	896	3' UTR Constitutivo
T=contig37980	897	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11107_1	898	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11705_1	899	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11899_1	900	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS12698_2	901	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS13580_1	902	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1404_1	903	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS14743_1	904	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS181186_1	905	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS19095_1	906	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_13	907	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_14	908	3' UTR Constitutivo
T-SETIT28JUL09CLUS1910_16	909	3' UTR Constitutivo
T-SETIT28JUL09CLUS1910_17	910	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_18	911	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_19	912	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS2157_4	913	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS2166_1	914	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS243_3	915	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS3485_1	916	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS364_1	917	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS36567_1	918	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS42130_1	919	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS52844_1	920	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS7004_1	921	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS83_23	922	3' UTR Constitutivo

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
T-SETIT-28JUL09-CLUS937_1	923	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS95524_1	924	3' UTR Constitutivo

En la Tabla 1 se presentan dos variantes de tamaño del promotor Act8 (Actina 8) del panizo común. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor de Actina 8 se proporciona en las Figuras 1a a 1c. El promotor, P-SETit.Act8-1:1:5 (SEQ ID NO: 24) tiene 1419 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Act8-1:1:6 (SEQ ID NO: 25) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Act8-1:1:5 (SEQ ID NO: 24) y tiene una longitud de 902 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Alc1 del panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Alc1 se proporciona en las Figuras 2a a 2c. El promotor, P-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 28) tiene 1577 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Alc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29) se compone de una deleción en 5' de P-SETitAlc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 28) y tiene una longitud de 412 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Cys del panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Cys se proporciona en las Figuras 3a a 3f. El promotor, P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) tiene 3277 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Cys-1:1:3(SEQ ID NO: 46) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) y tiene una longitud de 2020 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Dzs del panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Dzs se proporciona en las Figuras 4a a 4f. El promotor, P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) tiene 3508 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) y tiene una longitud de 1008 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Gst del panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Gst se proporciona en las Figuras 5a a 5c. El promotor, P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) tiene 1681 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) y tiene una longitud de 428 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Ifr de panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Ifr se proporciona en las Figuras 6a a 6c. El promotor, P-SETit.Ifr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) tiene 1280 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Ifr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) y tiene una longitud de 275 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Nrt2 del panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Nrt2 se proporciona en las Figuras 7a a 7d. El promotor, P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) tiene 1866 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) y tiene una longitud de 382 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Ppc de panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Ppc se proporciona en las Figuras 8a a 8e. El promotor, P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) tiene 2722 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) y tiene una longitud de 1882 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Prx3 del panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Prx3 se proporciona en las Figuras 9a a 9f. El promotor, P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) tiene 3354 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) y tiene una longitud de 1908 nucleótidos.

Tres variantes de tamaño del promotor Rcc3 del panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Rcc3 se proporciona en las Figuras 10a a 10f. El promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) tiene 2062 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) y tiene una longitud de 2024 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) y tiene una longitud de 1563 nucleótidos. El promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) y tiene una longitud de 915 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Ssp1 del panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Ssp1 se proporciona en las Figuras 11a a 11b. El promotor, P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) tiene 1128 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Ssp1-1:1:2 (SEQ ID NO: 94) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) y tiene una longitud de 479 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Tip de panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Tip se proporciona en las Figuras 12a a 12d. El promotor, P-SETit.Tip-1:1:4

(SEQ ID NO: 97) tiene 2108 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 96) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) y tiene una longitud de 917 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor TubA2-1 de panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor TubA2-1 se proporciona en las Figuras 13a a 13d. El promotor, P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98) tiene 1593 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.TubA2-1-1:1:3 (SEQ ID NO: 99) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98) y tiene una longitud de 856 nucleótidos.

Dos variantes de tamaño del promotor Ubq1 del panizo común se presentan en la Tabla 1. La alineación de las variantes de tamaño para el promotor Ubq1 se proporciona en las Figuras 14a a 14c. El promotor, P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) tiene 1492 nucleótidos de longitud. El promotor, P-SETit.Ubq1-1:1:3 (SEQ ID NO: 103) se compone de una deleción en 5' de P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) y tiene una longitud de 680 nucleótidos.

Las composiciones derivadas de cualquiera de los promotores presentados como SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536 compuestos de deleciones internas o en 5' pueden construirse usando procedimientos conocidos en la técnica para mejorar la expresión, eliminando elementos que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; o duplicando elementos que tienen efectos positivos o negativos sobre la expresión; o duplicando o eliminando elementos que tienen efectos específicos de tejido o célula sobre la expresión. Las composiciones derivadas de cualquiera de los promotores presentados como SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536 que constan de deleciones en 3' en las que el elemento de la secuencia TATA o su secuencia equivalente y la secuencia en la dirección 3' que se eliminan se pueden usar para hacer elementos potenciadores. Se pueden hacer más deleciones para eliminar cualesquiera elementos que tengan efectos positivos o negativos; o específicos de tejido; o específicos de células; o específicos de tiempo (por ejemplo, aunque no de forma limitativa, de los ritmos circadianos) sobre la expresión. Cualquiera de los promotores presentados como SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536 y los fragmentos o potenciadores derivados de los mismos se pueden usar para hacer composiciones de elementos reguladores de la transcripción quiméricos que comprenden cualquiera de los promotores presentados como SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536 y los fragmentos o potenciadores derivados de los unidos operativamente a otros potenciadores y promotores. La eficacia de las modificaciones, duplicaciones o deleciones descritas anteriormente sobre los aspectos de la expresión deseados de un transgén concreto se ensayaron empíricamente en ensayos de plantas estables y transitorios, ya que el efecto de tales alteraciones en la composición del promotor nativo no es fácilmente predecible y requiere pruebas empíricas para validar tales efectos.

Las secuencias líder (5' UTR) presentadas como SEQ ID NOS: 106 a 171 y las SEQ ID NOS: 537 a 588 pueden estar compuestas por elementos reguladores o pueden adoptar estructuras secundarias que pueden tener un efecto en la transcripción o traducción de un transgén. Las secuencias líder presentadas como SEQ ID NOS: 106 a 171 y SEQ ID NOS: 537 a 588 se pueden usar para preparar elementos reguladores quiméricos que afectan a la transcripción o traducción de un transgén. Además, las secuencias líder presentadas como SEQ ID NOS: 106 a 171 y las SEQ ID NOS: 537 a 588 se pueden usar para hacer secuencias líder quiméricas que afectan la transcripción o traducción de un transgén.

Las composiciones derivadas de cualquiera de los intrones presentados como SEQ ID NOS: 172 a 267, SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778 pueden estar compuestas de deleciones internas o duplicaciones de elementos reguladores en cis; o alteraciones de las secuencias 5' y 3' que comprenden las uniones de corte y empalme intrón/exón, se pueden usar para mejorar la expresión o especificidad de expresión cuando están unidas operativamente a un promotor + líder o promotor quimérico + líder y secuencia de codificación. Se pueden realizar también alteraciones de las regiones 5' y 3' que comprenden la unión de corte y empalme del intrón/exón para reducir el potencial para la introducción de falsos codones de inicio y de terminación que se producen en el transcrito resultante tras el procesamiento y el corte y empalme del ARN mensajero. Los intrones se prueban empíricamente como se describe a continuación para determinar su efecto en la expresión de un transgén.

Ejemplo 2: Análisis de elementos reguladores que dirigen GUS en maíz transgénico

Se transformaron plantas de maíz con vectores de expresión de plantas que contenían los elementos reguladores de ensayo que dirigen la expresión del transgén de la β-glucuronidasa (GUS), y las plantas resultantes se analizaron para determinar la expresión de la proteína GUS.

Las plantas de maíz se transformaron con las construcciones de expresión de GUS de la planta, enumeradas en la Tabla 2, a continuación. Los elementos reguladores y los elementos reguladores quiméricos presentados en el ejemplo 1 se clonaron en un vector de expresión de planta básico usando procedimientos estándares conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de las plantas resultantes contienen una región del borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete del transgén para probar el elemento regulador o un elemento regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de la β-glucuronidasa (GUS) que bien tiene un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o ningún intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación

en 3' de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o a la región de terminación en 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por grupo del elemento regulador de la transcripción de la Actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098), o alternativamente, el antibiótico kanamicina (impulsado por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de la Actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) y una región del límite izquierdo procedente de *A. tumefaciens*. Los plásmidos resultantes, pMON109728, pMON112215, pMON116789, pMON116816, pMON116818, pMON116820, pMON116829, pMON120698, pMON120699, pMON120700, pMON120701, pMON120702, pMON120703, pMON120704, pMON120705, pMON120706, pMON120709, pMON120710, pMON120711, pMON120712, pMON120713, pMON127440, pMON127441, pMON127442, pMON127443, pMON127444, pMON127445, pMON127446, pMON127447, pMON127448, pMON127449 y pMON132037 se utilizaron para transformar plantas de maíz.

Tabla 2. Construcciones binarias de transformación de plantas, Elementos reguladores o reguladores quiméricos, GUS y 3' UTR.

Construcción	Elementos reguladores	GUS	3' UTR
pMON109728	EXP-FMV.35S-SETit.Tip (SEQ ID NO: 8) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 96) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON112215	P-SETitRcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON116789	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON116816	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON116818	P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON116820	P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON1 16829	P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-1	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON120698	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:a (SEQ ID NO: 6) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120699	EXP-FMV.35S-SETit.Gst: a (SEQ ID NO: 2) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON1 20700	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:b (SEQ ID NO: 7) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120701	EXP-FMV.35S-SETit.Pox (SEQ ID NO: 5) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120702	P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120703	EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120704	P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120705	EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	GUS	3' UTR
pMON120706	EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON1 20709	P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120710	P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120711	P-SETit.Pip2-1:1:3 (SEQ ID NO: 71) L-SETit.Pip2-1:1:1 (SEQ ID NO: 145)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120712	P-SETit.Ifr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON120713	P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127440	P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127441	P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127442	P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55) L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127443	EXP-SETit.Ppdk:1:1 (SEQ ID NO: 14) P-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 76) L-SETit.Ppdk-1:1:4 (SEQ ID NO: 150) I-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 175) L-SETit.Ppdk-1:1:2 (SEQ ID NO: 149)	GUS2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127444	P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127445	P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33) L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127446	P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127447	P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127448	P-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 32) L-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 113)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON127449	P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51) L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1
pMON132037	EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)	GUS-2	T-Os.LTP-1:1:1

El vector de transformación de plantas, pMON109728 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Tip (SEQ ID NO: 8), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), 5' unido operativamente al elemento promotor, P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 96), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165). El vector de transformación de plantas, pMON112215 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161) El vector de transformación de la planta, pMON116789 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON116816 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON116818 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147). El vector de transformación de plantas, pMON116820 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135). El vector de transformación de plantas, pMON116829 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89), unido operativamente en 5' al

elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON120698 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:a (SEQ ID NO: 6), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON120699 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Gst: a (SEQ ID NO: 2), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135). El vector de transformación de plantas, pMON120700 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:b (SEQ ID NO: 7), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON120701 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Pox (SEQ ID NO: 5), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147). El vector de transformación de plantas, pMON120702 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116). El vector de transformación de plantas, pMON120703 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116). El vector de transformación de plantas, pMON120704 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135). El vector de transformación de plantas, pMON120705 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135). El vector de transformación de plantas, pMON120706 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4), que comprende además el elemento potenciador, E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351), unido operativamente en 5' al elemento promotor, P-SETit.Ifr-1: 1:3 (SEQ ID NO: 61), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136). El vector de transformación de plantas, pMON120709 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139). El vector de transformación de plantas, pMON120710 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139). El vector de transformación de plantas, pMON120711 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Pip2-1:1:3 (SEQ ID NO: 71), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Pip2-1:1:1 (SEQ ID NO: 145). El vector de transformación de plantas, pMON120712 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Ifr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136). El vector de transformación de plantas, pMON120713 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136). El vector de transformación de plantas, pMON127440 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148). El vector de transformación de plantas, pMON127441 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148) El vector de transformación de la planta, pMON127442 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133). El vector de transformación de plantas, pMON127443 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Ppdk:1:1 (SEQ ID NO: 14), elemento promotor, P-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 76), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ppdk-1:1:4 (SEQ ID NO: 150), unido operativamente en 5’ al elemento intrónico, I-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 175), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ppdk-1:1:2 (SEQ ID NO: 149). El vector de transformación de plantas, pMON127444 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124). El vector de transformación de plantas, elemento pMON127445 promotor, P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114). El vector de transformación de plantas, pMON127446 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159). El vector de transformación de plantas, pMON127447 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160). El vector de transformación de plantas, pMON127448 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 32), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 113). El vector de transformación de plantas, pMON127449 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131). El vector de transformación de plantas, pMON132037 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102), unido operativamente en 5’ al elemento líder, L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169), unido operativamente en 5’ al

elemento intrónico, I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177).

Las plantas de maíz se transformaron con construcciones de expresión GUS de plantas, pMON109728, pMON112215, pMON116789, pMON116816, pMON116818, pMON116820, pMON116829, pMON120698, pMON120699, pMON120700, pMON120701, pMON120702, pMON120703, pMON120704, pMON120705, pMON120706, pMON120709, pMON120710, pMON120711, pMON120712, pMON120713, pMON127440, pMON127441, pMON127442, pMON127443, pMON127444, pMON127445, pMON127446, pMON127447, pMON127448, pMON127449 y pMON132037.

Las plantas se transformaron utilizando transformaciones *mediadas por Agrobacterium* conocidas por los expertos en la técnica. En resumen, los embriones de semilla de maíz LH244 se extrajeron de la superficie esterilizada, desarrollando granos de maíz aproximadamente 9 a 13 días después de la polinización. Los embriones se cultivaron simultáneamente con *Agrobacterium tumefaciens,* transformado con las construcciones de expresión GUS durante 18 a 28 horas en la oscuridad. Los embriones se transfirieron a continuación a medios selectivos y se cultivaron en la oscuridad durante aproximadamente 3 semanas para inducir la formación de callos. Después de la inducción del callo, el tejido del callo derivado del embrión se transfirió a medio nuevo y se cultivó con luz durante 5 a 10 días. El tejido del callo se transfirió a continuación a medio nuevo para inducir la formación de brotes. Después de 2 a 3 semanas, los brotes transformados se transfirieron a un medio de enraizamiento y se cultivaron para permitir la formación de raíces. Una vez que se ha producido suficiente formación de raíces, las plantas transformadas se transfirieron al suelo y se transfieren al invernadero. Los eventos que contenían una o dos copias del casete del transgén se seleccionaron para su estudio utilizando procedimientos de PCR en tiempo real conocidos por los expertos en la materia.

El análisis histoquímico de GUS se utilizó para el análisis de expresión cualitativa de plantas transformadas. Se incubaron secciones de tejido completas con solución de tinción GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-glucurónido) (1 miligramo/mililitro) durante un período de tiempo apropiado, se enjuagaron y se inspeccionaron visualmente para determinar la coloración azul. La actividad de GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio utilizando órganos y tejidos de plantas seleccionadas. Se inspeccionaron las plantas R0 para determinar su expresión en las raíces y hojas.

Para el análisis cuantitativo, se extrajo la proteína total de tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metileumbeliferil-β-D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se midió con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm utilizando un Fluoromax-3 con Micromax Reader, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm.

La expresión de R_0 GUS promedio observada para cada transformación se presenta en las Tablas 3 y 4 a continuación.

Tabla 3. Expresión promedio de GUS R_0 en hojas y raíces de plantas de maíz transgénicas, transformadas con las construcciones relacionadas.

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON109728	EXP-FMV.35S-SETit.Tip (SEQ ID NO: 8) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 177) P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 95) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	11,98	nd	14,78	423,85	nd	11,38
pMON112215	P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pMON116789	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	43,43	nd	363,90	19,09	12,16	6,58
pMON116816	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	5,77	nd	0,00	35,02	nd	0,00
pMON116818	P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	8,10	nd	0,00	22,96	0,00	0,00
pMON116820	P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	0,00	nd	12,06	5,21	0,00	8,85
PMON116829	P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	20,67	nd	0,00	0,00	0,00	0,00

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON120698	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:a (SEQ ID NO: 6) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	0,00	nd	12,90	0,00	0,00	0,00
pMON120699	EXP-FMV.35S-SETit.Gst: a (SEQ ID NO: 2) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	19,42	nd	147,75	47,82	26,76	116,51
pMON120700	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:b (SEQ ID NO: 7) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	nd	11,97	12,18	0,00	5,16	0,00
pMON120701	EXP-FMV.35S-SETit.Pox (SEQ ID NO: 5) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	10,42	35,53	22,82	0,00	0,00	0,00
pMON120702	P-SETit.Ccoamt-1:1: 2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1: 2 (SEQ ID NO: 116)	0,00	nd	14,98	0,00	0,00	8,81
pMON120703	EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Ccoamt-1:1: 2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1: 2 (SEQ ID NO: 116)	9,79	nd	93,87	12,14	67,80	22,52
pMON120704	P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO:135)	7,12	nd	24,05	0,00	8,78	0,00
pMON120705	EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	19,48	nd	38,27	34,28	136,79	104,30
pMON120706	EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	25,62	nd	92,11	32,18	191,22	107,41
pMON120709	P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	10,40	nd	7,20	0,00	0,00	0,00
pMON120710	P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	17,29	nd	11,89	0,00	0,00	0,00
pMON120711	P-SETit.Pip2-1:1:3 (SEQ ID NO: 71) L-SETit.Pip2-1:1:1 (SEQ ID NO: 145)	168,44	36,18	14,61	22,48	0,00	7,04
pMON120712	P-SETit.Ifr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	64,92	nd	15,97	0,00	0,00	0,00
pMON120713	P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	0,00	nd	0,00	0,00	0,00	6,38
pMON127440	P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	0,00	nd	0,47	0,00	0,00	37,59
pMON127441	P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	0,00	0,00	0,00	101,10	521,14	179,12
pMON127442	P-SETit.Gapdh2-1: 1:3 (SEQ ID NO: 55) L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)	0,00	0,00	0,00	13,12	0,00	0,00

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON127443	EXP-SETit.Ppdk:1:1 (SEQ ID NO: 14) P-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 76) L-SETit.Ppdk-1:1:4 (SEQ ID NO: 150) I-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 175) L-SETit.Ppdk-1:1:2 (SEQ ID NO: 149)	0,00	0,00	5,66	32,56	21,04	58,48
pMON127444	P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)	0,00	6,17	0,00	165,74	348,96	249,42
pMON127445	P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33) L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	299,16	136,85	179,80
pMON127446	P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)	0,00	0,00	0,00	101,30	83,44	110,81
pMON127447	P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)	0,00	22,74	18,69	160,14	172,65	264,89
pMON127448	P-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 32) L-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 113)	0,16	0,00	0,00	158,08	109,59	48,01
pMON127449	P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51) L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	81,41	82,57	83,95
pMON132037	EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)	0,00	28,54	57,31	57,95	36,71	45,62

El nivel promedio de expresión de GUS entre las construcciones varió. Las construcciones que demostraron el nivel más alto de expresión en la raíz, particularmente en la etapa VT fueron: pMON116789 ((P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) + L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)); pMON120699 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:a (SEQ ID NO: 2), que consta de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)); pMON120703 ((EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1), que consta de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETitCcoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) + L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)); pMON120706 ((EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4) compuesto de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) + L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)) and pMON132037 ((EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) compuesto de P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) + L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) + I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)).

Las construcciones que demuestran el nivel más alto de expresión en la hoja fueron: pMON127447 ((P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) + L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)); pMON127444 ((P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) + L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)); pMON127445 ((P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33) + L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114)); pMON127441 ((P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) + L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)); pMON120699 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:a (SEQ ID NO: 2) compuesto de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)); pMON127446 ((P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) + L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)); pMON120706 ((EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4) compuesto de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) + L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)); pMON120705 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) compuesto de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)) and pMON127449 ((P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51) + L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131)).

Tabla 4. Expresión promedio de GUS R_0 en anteras, estigma, endospermo y embriones de plantas de maíz transgénicas, transformadas con las construcciones relacionadas.

Construcción	Elementos reguladores	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON109728	EXP-FMV.35S-SETit.Tip (SEQ ID NO: 8) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 177) P-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 95) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	nd	74,07	nd	nd
pMON112215	P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) L-SETitRcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)	nd	nd	nd	nd
pMON116789	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	289,88	11,83	nd	nd

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON116816	P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	9,66	0,00	17,06	20,16
pMON116818	P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	0,00	10,12	0,00	0,00
pMON116820	P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	19,62	8,08	14,09	15,25
PMON116829	P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	8,58	0,00	0,00	12,52
pMON120698	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:a (SEQ ID NO: 6) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:10 (SEQ ID NO: 89) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	0,00	0,00	13,62	23,07
pMON120699	EXP-FMV.35S-SETit.Gst: a (SEQ ID NO: 2) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	41,63	21,74	27,03	92,79
pMON120700	EXP-FMV.35S-SETit.Rcc3:b (SEQ ID NO: 7) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	7,65	0,00	0,00	11,30
pMON120701	EXP-FMV.35S-SETit.Pox (SEQ ID NO: 5) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 73) L-SETit.Pox-1:1:1 (SEQ ID NO: 147)	55,20	77,97	0,00	10,70
pMON120702	P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	33,96	0,00	0,00	6,93
pMON120703	EXP-FMV.35S-SETit.Ccoamt (SEQ ID NO: 1) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 35) L-SETit.Ccoamt-1:1:2 (SEQ ID NO: 116)	22,01	36,65	9,23	28,99
pMON120704	P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	16,43	0,00	nd	nd
pMON120705	EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)	156,37	46,06	39,48	82,83
pMON120706	EXP-FMV.35S-SETit.lfr (SEQ ID NO: 4) E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 351) P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	77,35	307,35	14,27	100,43
pMON120709	P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	6,90	132,25	138,75	20,39
pMON120710	P-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 64) L-SETit.Nit2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)	8,60	0,00	12,49	6,52
pMON120711	P-SETit.Pip2-1:1:3 (SEQ ID NO: 71) L-SETit.Pip2-1:1:1 (SEQ ID NO: 145)	15,13	6,65	10,49	0,00
pMON120712	P-SETit.lfr-1:1:2 (SEQ ID NO: 60) L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	9,64	0,00	8,26	0,00
pMON120713	P-SETit.lfr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) L-SETit.lfr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)	11,02	0,00	23,91	5,94
pMON127440	P-SETit.Ppc-1:1:3 (SEQ ID NO: 74) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	18,44	1,15	0,00	0,00
pMON127441	P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)	181,79	0,00	4,10	1,17

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON127442	P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55) L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)	28,05	0,00	155,68	400,86
pMON127443	EXP-SETit.Ppdk:1:1 (SEQ ID NO: 14) P-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 76) L-SETit.Ppdk-1:1:4 (SEQ ID NO: 150) I-SETit.Ppdk-1:1:1 (SEQ ID NO: 175) L-SETit.Ppdk-1:1:2 (SEQ ID NO: 149)	0,00	0,00	2,62	0,67
pMON127444	P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)	87,67	24,63	0,00	0,00
pMON127445	P-SETit.Cab3-1:1:3 (SEQ ID NO: 33) L-SETit.Cab3-1:1:1 (SEQ ID NO: 114)	35,79	35,94	< 0,1	< 0,1
pMON127446	P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)	56,44	194,45	1,64	3,24
pMON127447	P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)	102,30	125,45	3,25	6,58
pMON127448	P-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 32) L-SETit.Cab1-1:1:1 (SEQ ID NO: 113)	61,33	22,61	2,32	4,47
pMON127449	P-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 51) L-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 131)	12,62	< 0,1	< 0,1	< 0,1
pMON132037	EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) L-SETit.Ubq 1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)	131,65	85,35	59,09	67,31

El nivel promedio de expresión de GUS en la semilla y los tejidos reproductivos varió entre las construcciones. Los niveles más altos de expresión en antera en la etapa VT se observaron para pMON116789 ((P-SETit.Rcc3-1:1:11 (SEQ ID NO: 90) + L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)); pMON127441 ((P-SETit.Ppc-1:1:4 (SEQ ID NO: 75) + L-SETit.Ppc-1:1:1 (SEQ ID NO: 148)); pMON120705 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) compuesto de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)); pMON132037 ((EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) compuesto de P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) + L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) + I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)); pMON127447 ((P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) + L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)); pMON127444 ((P-SETit.CP29-1:1:4 (SEQ ID NO: 42) + L-SETit.CP29-1:1:1 (SEQ ID NO: 124)) y pMON120706 ((EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4) compuesto de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) + L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)).

Los niveles más altos de expresión de GUS promedio en el estigma se observaron en plantas transformadas con pMON120706 ((EXP-FMV.35S-SETit.Ifr (SEQ ID NO: 4) compuesta de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Ifr-1:1:3 (SEQ ID NO: 61) + L-SETit.Ifr-1:1:1 (SEQ ID NO: 136)); pMON127446 ((P-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 86) + L-SETit.PSI-4a-1:1:1 (SEQ ID NO: 159)); pMON120709 ((P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) + L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)); pMON127447 ((P-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 87) + L-SETit.Rbcs-1:1:1 (SEQ ID NO: 160)) y pMON132037 ((EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) comprendía P-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) + L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) + I-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)). La expresión de GUS promedio en el embrión en desarrollo 21 DAP se observó en plantas transformadas con pMON127442 ((P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55) + L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)); pMON120709 ((P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) + L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139)); pMON132037 ((EXP-SETit.Ubq1:1:1 (SEQ ID NO: 20) comprendía P-SETit.Ubq 1-1:1:1 (SEQ ID NO: 102) + L-SETit.Ubq1-1:1:1 (SEQ ID NO: 169) + I-SETit.Ubq 1-1:1:1 (SEQ ID NO: 177)); pMON120705 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst:b (SEQ ID NO: 3) compuesta de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETitGst-1:1:2 (SEQ ID NO: 59) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)) y pMON120699 ((EXP-FMV.35S-SETit.Gst: a (SEQ ID NO: 2) compuesta de E-FMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 179) + P-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 58) + L-SETit.Gst-1:1:1 (SEQ ID NO: 135)). La expresión de GUS promedio también fue más alta en plantas transformadas con pMON127442 ((P-SETit.Gapdh2-1:1:3 (SEQ ID NO: 55) + L-SETit.Gapdh2-1:1:1 (SEQ ID NO: 133)) y pMON120709 ((P-SETit.Nrt2-1:1:3 (SEQ ID NO: 65) + L-SETit.Nrt2-1:1:2 (SEQ ID NO: 139))

Plantas transformadas con los vectores de expresión GUS, pMON112215 ((P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) + L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)) se cruzaron con plantas LH244 no transformadas para producir una población F1 de transformantes. Los niveles de expresión de GUS se midieron en tejidos seleccionados durante el desarrollo. Los tejidos F1 utilizados para este estudio incluyeron: embrión de semillas absorbidas, endosperma de semillas absorbidas, raíz (3 días después de la germinación), coleóptilos (3 días después de la germinación), raíz V3, Hoja V3, raíz V7, hoja madura V7, VT (en panoja, antes de la reproducción) raíz seminal, entrenudo VT, mazorca VT, antera VT, polen VT, estigma VT, núcleo 7 días después de la polinización, embrión 21 días después de la

polinización, endospermo 21 días después de la polinización, embrión 35 días después de la polinización, endospermo 35 días después de la polinización.

Se indujo estrés por sequía en las plantas R_0 V3 y en las plantas F1 V3 al suspender el riego durante 4 días, lo que permitió reducir el contenido de agua en al menos el 50% del contenido original de agua de la planta completamente regada. El protocolo de sequía estaba compuesto esencialmente por los siguientes pasos. Las plantas en la etapa V3 fueron privadas de agua. Cuando una planta de maíz experimenta sequía, la forma de la hoja cambiará de la apariencia saludable y desplegada habitual a una hoja que muestra un plegamiento en el haz vascular de la costilla media y aparece en forma de V cuando se ve desde la punta de la hoja hasta el tallo. Este cambio en la morfología por lo general comenzó a ocurrir aproximadamente 2 días después del cese del riego y, en experimentos anteriores, se demostró que se asociaba con una pérdida de agua de alrededor del 50%, según el peso de las macetas antes del cese del riego y el peso de las macetas cuando la morfología de la curvatura de la hoja se observó en plantas sin regar. Las plantas fueron consideradas en condiciones de sequía, cuando las hojas mostraban marchitamiento, como lo demuestra una curvatura interna (forma de V) de la hoja. Este nivel de estrés se considera una forma de estrés subletal. Se tomaron muestras de hojas de control de cada planta para realizar pruebas de GUS antes de la inducción de la sequía. Luego se indujo la sequía (indicada como "Des" en la Tabla 5 a continuación) y una vez que cada planta demostró la inducción de la sequía como se definió anteriormente, La planta se destruyó para adquirir muestras de raíces y hojas. Los niveles de expresión de GUS en las hojas se compararon con las muestras de tejido de control de las mismas plantas antes de la sequía. Para las plantas de generación R_0, se utilizaron catorce plantas para cada vector. Para el análisis de F1, se utilizaron ocho plantas para cada vector y se tomaron las medidas de GUS como se describió anteriormente. Cuatro de las plantas F1 se destruyeron para el muestreo de tejido para el ensayo de GUS (Des) después de la inducción de la sequía. Se permitió que las otras dos plantas F1 se recuperaran y luego se tomaron muestras destructivamente para determinar si el patrón de expresión de GUS en recuperación era el mismo que el anterior a la imposición de la sequía.

Además de la sequía, las plántulas en germinación F1 y las plantas en etapa F1 V3 transformadas con los vectores presentados en la Tabla 2 también se expusieron a condiciones de frío para determinar si los elementos reguladores y los elementos reguladores quiméricos demostraron la expresión de GUS inducida por el frío. Sesenta semillas, que comprendían 6 semillas de cada uno de los 10 eventos de transformación para cada elemento regulador o elemento regulador quimérico, se sometieron a ensayo para inducir la expresión génica en condiciones de frío. Las semillas se germinaron en placas petri sobre papel de filtro saturado de agua. Tres días después de la germinación, las plántulas se expusieron a estrés por frío colocando las placas Petri que contenían las plántulas germinadas en una cámara de crecimiento oscuro fijada a 10 grados centígrados durante 24 horas. Al final del período de 24 horas, los tejidos de la raíz y de los coleóptilos se tomaron para la expresión cuantitativa de GUS como se describe anteriormente. Se sometieron a ensayo plantas enteras para determinar la inducción de la expresión de GUS bajo estrés por frío en la etapa V3. Veinte plantas de maíz de la etapa V3, que comprendían 2 plantas de cada uno de los 10 eventos de transformación para cada elemento regulador o elemento regulador quimérico, se expusieron a una temperatura de 12 grados centígrados en una cámara de crecimiento durante 24 horas. Las plantas en la cámara de crecimiento se cultivaron bajo una fluencia de luz blanca de 800 micromoles por metro cuadrado por segundo con un ciclo de luz de diez horas de luz blanca y catorce horas de oscuridad. Tras la exposición al frío, se tomaron muestras de los tejidos de las hojas y las raíces para determinar la exposición cuantitativa a GUS como se describe anteriormente. La Tabla 5 a continuación muestra el nivel de expresión de GUS en tejidos seleccionados en plantas F1 transformadas con pMON112215.

Tabla 5. Expresión de GUS F1 en plantas de maíz transgénicas, transformadas con pMON112215.

Etapas	Órgano	Inductor	Media	DE
Semilla absorbida	Embrión	-	22,6	1,54
Semilla absorbida	Endospermo	-	7,48	1,64
3 DAG	Raíz	-	0	0
V3	Raíz principal	Átono	0	0
V3	Corona de raíces	-	0	0
V3	Raíz principal	Frío	0	0
V3	Corona de raíces	-	0	0
V3	Raíz principal	Des	0	0
V3	Corona de raíces	-	nd	nd
V7	Raíz seminal	-	0	0
V7	Corona de raíces	-	0	0
VT	Raíz seminal	-	8,26	1,38
3 DAG	Coleóptilo	-	0	0

(continuación)

Etapas	Órgano	Inductor	Media	DE
V3	Hojas	Átono	0	0
V3	Hojas	Frío	0	0
V3	Hojas	Des	6,18	0,3
V7	Hoja - Madura	-	0	0
VT	Entrenudo	-	9,83	3,47
VT	Mazorca	-	7,38	1,78
VT	Antera	-	1060,86	849,27
VT	polen	-	200,74	101,84
VT	Estigma	-	16,63	9,45
21 DAP	Embrión	-	18,6	2,18
35 DAP	Embrión	-	4,16	1,35
10 DAP	grano	-	0	0
21 DAP	Endospermo	-	11,14	0
35 DAP	Endospermo	-	3,26	2,27

Las plantas de maíz F1, transformadas con pMON112215 ((P-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 88) + L-SETit.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 161)) demostraron altos niveles de expresión en el tejido de la antera VT. También se observó que la expresión en el polen es más alta que en otros tejidos además de la antera. Se observó que la expresión estaba alrededor de los niveles de fondo en el desarrollo de embriones y endospermas, estigma VT, raíz seminal de la TV y entrenudo de la TV. Usando procedimientos de ensayo más sensibles como el ELISA de la expresión de TIC809, el promotor y líder SETit.Rcc3 habían demostrado anteriormente que dirigían la expresión de un transgén en tejidos de la raíz del maíz transformados de forma estable (documento WO 2009/126470).

Ejemplo 3: Análisis de elementos reguladores que dirigen GUS en maíz transgénico

Tejido de raíces y hojas de maíz procedentes de plántulas de 12 a 13 días de edad se bombardean con vectores de control y expresión de GUS de la planta para determinar la capacidad de los elementos reguladores de la transcripción derivados de *Setaria italica* para dirigir la expresión de un transgén, GUS.

Los tejidos de las plantas de maíz se transformaron con las construcciones de expresión de GUS de la planta, enumeradas en la Tabla 6, a continuación. Los elementos reguladores presentados en el ejemplo 1 se clonaron en un vector de expresión de planta básico utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de las plantas resultantes contienen una región del borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete del transgén para probar el elemento regulador o un elemento regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de la β-glucuronidasa (GUS) que tiene un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091), unida operativamente a la región de terminación 3 'del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por grupo del elemento regulador de la transcripción de la Actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098), y una región límite izquierda de *A. tumefaciens.* Los plásmidos resultantes, pMON129227, pMON129228, pMON129229, pMON129230, pMON129231, pMON129232, pMON129233, pMON129234, pMON129235, pMON129236, pMON129237, pMON129238, pMON129239, pMON129240, pMON129241, pMON129242, pMON129243, pMON129244, pMON129245, pMON129246, pMON129247, pMON129248, pMON129249, pMON129250, pMON129251, pMON129252, pMON129253, pMON129254, pMON129255, pMON129256, pMON129257, Se utilizaron pMON129258 y pMON129259 para transformar tejido de plantas de maíz usando bombardeo de partículas.

Tabla 6. Vectores binarios de transformación de plantas, Elementos reguladores o reguladores quiméricos, GUS y 3' UTR.

Construcción	Elementos reguladores	3’ UTR
pMON129227	P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43) L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129228	P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44) L-SETit.Cyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129229	P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66) L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140)	T-Os.LTP-1:1:1

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON129230	P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67) L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129231	P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129232	P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56) L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129233	P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81) L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129234	P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92) L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129235	P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62) L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129236	P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27) L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129237	P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79) L-SETitPrx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129238	P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34) L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129239	P-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54) L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129240	P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36) L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129241	P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129242	P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129243	P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84) L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129244	P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49) L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129245	P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69) L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129246	P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129247	P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129248	P-SETit.Ucc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 105) L-SETit.Ucc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 170)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129249	P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129250	P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129251	P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80) L-SETitPrx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129252	P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63) L-SETit.Mt1 -1:1:1 (SEQ ID NO: 138)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129253	P-SETit.Ali1-1:1:3 (SEQ ID NO: 31) L-SETit.Ali1 -1:1:1 (SEQ ID NO: 112)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129254	P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129255	P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129256	P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95)	T-Os.LTP-1:1:1

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON129257	P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129258	P-SETit.Grf-1:1:2 (SEQ ID NO: 57)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129259	P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70) L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144)	T-Os.LTP-1:1:1

El vector de transformación de plantas, pMON129227 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125). El vector de transformación de plantas, pMON129228 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETitCyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126). El vector de transformación de plantas, pMON129229 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140). El vector de transformación de plantas, pMON129230 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142). El vector de transformación de plantas, pMON129231 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141). El vector de transformación de plantas, pMON129232 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134). El vector de transformación de plantas, pMON129233 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155). El vector de transformación de plantas, pMON129234 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163). El vector de transformación de plantas, pMON129235 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137). El vector de transformación de plantas, pMON129236 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109). El vector de transformación de plantas, pMON129237 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153). El vector de transformación de plantas, pMON129238 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115). El vector de transformación de plantas, pMON129239 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132). El vector de transformación de plantas, pMON129240 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117). El vector de transformación de plantas, pMON129241 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156). El vector de transformación de plantas, pMON129242 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156). El vector de transformación de plantas, pMON129243 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157). El vector de transformación de plantas, pMON129244 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129). El vector de transformación de plantas, pMON129245 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143). El vector de transformación de plantas, pMON129246 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127). El vector de transformación de plantas, pMON129247 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127). El vector de transformación de plantas, pMON129248 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Ucc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 105), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ucc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 170). El vector de transformación de plantas, pMON129249 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165). El vector de transformación de plantas, pMON129250 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158). El vector de transformación de plantas, pMON129251 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154). El vector de transformación de plantas, pMON129252 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Mt1-1:1:1 (SEQ ID NO: 138). El vector de transformación de plantas, pMON129253 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Ali1-1:1:3 (SEQ ID NO: 31), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ali1-1:1:1 (SEQ ID NO: 112). El vector de transformación de plantas, pMON129254 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON129255 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146). El vector de transformación de plantas, pMON129256 está compuesto

por el elemento promotor, P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95). El vector de transformación de plantas, pMON129257 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23). El vector de transformación de plantas, pMON129258 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Grf-1:1:2 (SEQ ID NO: 57). El vector de transformación de plantas, pMON129259 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144).

Los tejidos de plantas de maíz se transformaron con construcciones de expresión de GUS de plantas, pMON129227, pMON129228, pMON129229, pMON129230, pMON129231, pMON129232, pMON129233, pMON129234, pMON129235, pMON129236, pMON129237, pMON129238, pMON129239, pMON129240, pMON129241, pMON129242, pMON129243, pMON129244, pMON129245, pMON129246, pMON129247, pMON129248, pMON129249, pMON129250, pMON129251, pMON129252, pMON129253, pMON129254, pMON129255, pMON129256, pMON129257, pMON129258 y pMON129259, utilizando bombardeo de partículas.

El tejido de la planta de maíz se transformó utilizando procedimientos de bombardeo de partículas conocidos por los expertos en la técnica con los vectores descritos anteriormente. En resumen, las semillas de maíz LH244 se esterilizaron en superficie y se permitió que germinaran en bandejas con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Después de 12 a 13 días, el tejido se recogió en condiciones estériles de las plántulas y se usó para bombardeo. Aproximadamente 10 explantes de hojas y 15 raíces se utilizan para el bombardeo de cada construcción experimental. Las muestras de tejido se colocan al azar en una placa Petri que contiene medio de cultivo de plantas. Se usaron diez microgramos de ADN plasmídico para recubrir partículas de oro de 0,6 micrómetros (Catálogo n.º 165-2262 Bio-Rad, Hercules, CA) para bombardeo. Los macrotransportadores se cargaron con las partículas de oro recubiertas con ADN (Catálogo n.º 165-2335 Bio-Rad, Hercules CA). Se usó una pistola de biolística PDS 1000/He para la transformación (Catálogo n.º 165-2257 Bio-Rad, Hercules CA). Se permitió que los tejidos de raíces y hojas bombardeados se incubaran en oscuridad durante 24 horas a 26 grados centígrados. Tras esta incubación durante la noche, los tejidos se tiñeron en solución para la expresión de GUS durante la noche a 37 grados centígrados. Después de la tinción durante la noche, los tejidos se empaparon en etanol al 70 % durante la noche para eliminar la clorofila y revelar la tinción de GUS. Después se fotografiaron los tejidos y se asignó una escala de calificación de "0" a "4" que refleja el nivel de expresión de GUS en cada construcción.

Cuatro plásmidos de control también se utilizaron para el bombardeo, designados, pMON19469, pMON59327, pMON30098 y pMON103758. Los vectores plasmídicos, pMON19469, pMON59327 y pMON103758 contenían elementos reguladores de la transcripción conocidos que dirigían la expresión de GUS y se usaron como comparadores para la expresión. El vector plasmídico, pMON30098 estaba compuesto por un casete transgénico utilizado para la expresión de la proteína fluorescente verde y sirvió como control negativo en el ensayo de bombardeo. El vector plasmídico, pMON19469 está compuesto por un casete del transgén compuesto por el promotor P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), derivado del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, unido operativamente en 5' a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unida operativamente a una secuencia codificadora de β-glucuronidasa (GUS-3, SEQ ID NO: 1092), unida operativamente en 5' a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El vector plasmídico, pMON59327 está compuesto por un casete transgénico utilizado para la expresión de GUS que comprende el promotor Rcc3 de arroz (P-Os.Rcc3-1:1:24, SEQ ID NO: 1093) y el elemento líder (L-Os.Rcc3-1:1:1, SEQ ID NO: 1094) unido operativamente a un intrón en 5' procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO:1102), unida operativamente en 5' a una secuencia codificante de la β-glucuronidasa (GUS-3, SEQ ID NO: 1092), unida operativamente en 5' a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El vector plasmídico, pMON103758 está compuesto por un casete transgénico utilizado para la expresión de GUS que comprende el promotor Rcc3 de arroz (P-Os.Rcc3-1:1:24, SEQ ID NO: 1093) y el elemento líder (L-Os.Rcc3-1:1:1, SEQ ID NO: 1094) unido operativamente a un intrón en 5' procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente en 5' a una secuencia de codificación de la β-glucuronidasa (GUS-3, SEQ ID NO: 1092), unida operativamente en 5' a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El vector plasmídico, pMON30098 estaba compuesto por un casete de un transgén de la proteína fluorescente verde y sirvió como control negativo en el ensayo de bombardeo y estaba compuesto por un casete del transgén comprendido por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh (SEQ ID NO: 1095) que estaba además constituido por el promotor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:2 (SEQ ID NO: 1097) unido operativamente a un intrón en 5' procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente en 5' a una secuencia de codificación para GFP (CR-Av.GFP.nno, SEQ ID NO: 1103), unida operativamente en 5' a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088).

Las clasificaciones de expresión de GUS promedio del ensayo de partículas bombardeadas se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7. Clasificaciones de expresión de GUS promedio para la raíz de maíz bombardeada y el tejido de la hoja transformado con construcciones de expresión de GUS de plantas relacionadas.

Construcción	Elementos reguladores	Raíz	Hojas
pMON19469	Promotor P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096)	4	4
pMON59327	P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) L-Os.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 1094)	4	0
pMON30098 (Control Neg.)	EXP-CaMV.35S-enh (SEQ ID NO: 1095)	0	0
pMON103758	P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) L-Os.Rcc3-1:1:1 (SEQ ID NO: 1094)	3	0
pMON129227	P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43) L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125)	0	0
pMON129228	P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44) L-SETit.Cyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126)	1	0
pMON129229	P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66) L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140)	1	0
pMON129230	P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67) L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142)	2	0
pMON129231	P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)	3	0
pMON129232	P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56) L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134)	2	0
pMON129233	P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81) L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155)	1	0
pMON129234	P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92) L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	3	0
pMON129235	P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62) L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137)	1	0
pMON129236	P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27) L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109)	2	0
pMON129237	P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79) L-SETitPrx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153)	3	1
pMON129238	P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34) L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115)	0	0
pMON129239	P-SETitFst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54) L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132)	0	0
pMON129240	P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36) L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117)	0	0
pMON129241	P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	3	2
pMON129242	P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	3	1
pMON129243	P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84) L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157)	3	0
pMON129244	P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49) L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129)	1	0
pMON129245	P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69) L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143)	0	0
pMON1 29246	P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	2	0
pMON129247	P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	3	0
pMON129248	P-SETit.Ucc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 105) L-SETit.Ucc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 170)	3	1
pMON129249	P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)	3	1

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Raíz	Hojas
pMON129250	P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)	3	2
pMON129251	P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80) L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154)	0	0
pMON129252	P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63) L-SETit.Mt1-1:1:1 (SEQ ID NO: 138)	2	0
pMON129253	P-SETit.Ali1 -1:1:3 (SEQ ID NO: 31) L-SETit.Ali1-1:1:1 (SEQ ID NO: 112)	2	0
pMON129254	P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	3	1
pMON129255	P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)	3	0
pMON129256	P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95)	0	0
pMON129257	P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23)	0	0
pMON129258	P-SETit.Grf-1:1:2 (SEQ ID NO: 57)	0	0
pMON129259	P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70) L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144)	0	0

Se observó el nivel promedio más alto de expresión de GUS para tejidos de la raíz transformados por bombardeo de partículas utilizando las construcciones, pMON129231 ((P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) + L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)); pMON129234 ((P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92) + L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)); pMON129237 ((P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79) + L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153)); pMON129241 ((P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) + L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)); pMON129242 ((P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) + L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)); pMON129243 ((P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84) + L-SETitPrx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157)); pMON129247 ((P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) + L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)); pMON129248 ((P-SETit.Ucc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 105) + L-SETit.Ucc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 170)); pMON129249 ((P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) + L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)); pMON129250 ((P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) + L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)); pMON129254 ((P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) + L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)) y pMON129255 ((P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) + L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)). La expresión de la hoja se observó más alta en los tejidos bombardeados con los pMON129241 ((P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) + L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)) y pMON129250 ((P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) + L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)).

Ejemplo 4: Análisis de elementos reguladores que dirigen GUS en maíz transgénico

Se transformaron plantas de maíz con vectores de expresión de plantas que contenían los elementos reguladores de ensayo que dirigen la expresión del transgén de la β-glucuronidasa (GUS), y las plantas resultantes se analizaron para determinar la expresión de la proteína GUS.

Las plantas de maíz se transformaron con las construcciones de expresión de GUS de la planta, enumeradas en la Tabla 8, a continuación. Los elementos reguladores presentados en el Ejemplo 1 para la expresión de monocotiledóneas se clonaron en un vector de expresión de planta básico usando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de las plantas resultantes contienen una región del borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete del transgén para probar el elemento regulador o un elemento regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de la β-glucuronidasa (GUS) que tiene un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091), unida operativamente a la región de terminación 3 'del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por el promotor de Actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098), y una región límite izquierda de *A. tumefaciens.* Los plásmidos resultantes, pMON129227, pMON129228, pMON129229, pMON129230, pMON129231, pMON129232, pMON129233, pMON129234, pMON129235, pMON129236, pMON129237, pMON129238, pMON129239, pMON129240, pMON129241, pMON129242, pMON129243, pMON129244, pMON129245, pMON129246, pMON129247, pMON129249, pMON129250, pMON129251, pMON129252, pMON129253, pMON129254, pMON129255, pMON129256, pMON129257, pMON129258 y pMON129259 se utilizaron para transformar plantas de maíz.

Tabla 8. Vectores binarios de transformación de plantas, Elementos reguladores o reguladores quiméricos, GUS y 3' UTR.

Construcción	Elementos reguladores	3’ UTR
pMON129227	P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43) L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129228	P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44) L-SETit.Cyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129229	P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66) L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129230	P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67) L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129231	P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129232	P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56) L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129233	P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81) L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129234	P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92) L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129235	P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62) L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129236	P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27) L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129237	P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79) L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129238	P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34) L-SETit.C.bl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129239	P-SETitFst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54) L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129240	P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36) L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129241	P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129242	P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129243	P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84) L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129244	P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49) L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129245	P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69) L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129246	P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129247	P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129249	P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129250	P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129251	P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80) L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129252	P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63) L-SETit.Mt1-1:1:1 (SEQ ID NO: 138)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129253	P-SETit.Ali1-1: 1:3 (SEQ ID NO: 31) L-SETit.Ali1-1:1:1 (SEQ ID NO: 112)	T-Os.LTP-1:1:1

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON129254	P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129255	P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129256	P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129257	P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129258	P-SETit.Grf-1:1:2 (SEQ ID NO: 57)	T-Os.LTP-1:1:1
pMON129259	P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70) L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144)	T-Os.LTP-1:1:1

El vector de transformación de plantas, pMON129227 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125). El vector de transformación de plantas, pMON129228 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126). El vector de transformación de plantas, pMON129229 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140). El vector de transformación de plantas, pMON129230 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142). El vector de transformación de plantas, pMON129231 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141). El vector de transformación de plantas, pMON129232 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134). El vector de transformación de plantas, pMON129233 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155). El vector de transformación de plantas, pMON129234 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163). El vector de transformación de plantas, pMON129235 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137). El vector de transformación de plantas, pMON129236 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109). El vector de transformación de plantas, pMON129237 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153). El vector de transformación de plantas, pMON129238 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115). El vector de transformación de plantas, pMON129239 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132). El vector de transformación de plantas, pMON129240 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117). El vector de transformación de plantas, pMON129241 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156). El vector de transformación de plantas, pMON129242 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156). El vector de transformación de plantas, pMON129243 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157). El vector de transformación de plantas, pMON129244 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129). El vector de transformación de plantas, pMON129245 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143). El vector de transformación de plantas, pMON129246 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127). El vector de transformación de plantas, pMON129247 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127). El vector de transformación de plantas, pMON129249 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165). El vector de transformación de plantas, pMON129250 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158). El vector de transformación de plantas, pMON129251 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154). El vector de transformación de plantas, pMON129252 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Mt1-1:1:1 (SEQ ID NO: 138). El vector de transformación de plantas, pMON129253 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Ali1-1:1:3 (SEQ ID NO: 31), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ali1 -1:1:1 (SEQ ID NO: 112). El vector de transformación de plantas, pMON129254 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Rcc3-1:1:2

(SEQ ID NO: 162). El vector de transformación de plantas, pMON129255 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146). El vector de transformación de plantas, pMON129256 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95). El vector de transformación de plantas, pMON129257 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23). El vector de transformación de plantas, pMON129258 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Grf-1:1:2 (SEQ ID NO: 57). El vector de transformación de plantas, pMON129259 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144).

Las plantas de maíz se transformaron con construcciones de expresión GUS de plantas, pMON129227, pMON129228, pMON129229, pMON129230, pMON129231, pMON129232, pMON129233, pMON129234, pMON129235, pMON129236, pMON129237, pMON129238, pMON129239, pMON129240, pMON129241, pMON129242, pMON129243, pMON129244, pMON129245, pMON129246, pMON129247, pMON129249, pMON129250, pMON129251, pMON129252, pMON129253, pMON129254, pMON129255, pMON129256, pMON129257, pMON129258 y pMON129259.

Las plantas se transformaron utilizando transformaciones *mediadas por Agrobacterium* y embriones de semilla de maíz LH244 como se describe en el Ejemplo 2. Los tejidos de raíces y hojas se recogieron de 1 a 5 transformantes y se analizaron para determinar la expresión de GUS. El análisis histoquímico de GUS se utilizó para el análisis de expresión cualitativa de plantas transformadas. Se incubaron secciones de tejido completas con solución de tinción GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-glucurónido) (1 miligramo/mililitro) durante un período de tiempo apropiado, se enjuagaron y se inspeccionaron visualmente para determinar la coloración azul. La actividad de GUS se determinó cualitativamente mediante inspección visual directa o inspección bajo un microscopio utilizando órganos y tejidos de plantas seleccionadas. Se inspeccionaron las plantas R0 para determinar su expresión en las raíces y hojas.

Para el análisis cuantitativo, se extrajo la proteína total de tejidos seleccionados de plantas de maíz transformadas. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metileumbeliferil-β-D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se midió con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm utilizando un Fluoromax-3 con Micromax Reader, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm.

La expresión de GUS R_0 promedio para las plantas transgénicas transformadas con las construcciones descritas en la Tabla 8 se muestra en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9. Expresión promedio de GUS R0 V3 en hojas y raíces de plantas de maíz transgénicas, transformadas con las construcciones relacionadas.

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Hoja V3
pMON129227	P-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 43) L-SETit.Cyp-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 125)	0,00	0,00
pMON129228	P-SETit.Cyp78a-1:1:2 (SEQ ID NO: 44) L-SETit.Cyp78a-1:1:1 (SEQ ID NO: 126)	7,91	0,00
pMON129229	P-SETit.OMT2.1-1:1:2 (SEQ ID NO: 66) L-SETit.OMT2.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 140)	0,00	0,00
pMON129230	P-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 67) L-SETit.OMT2.2-1:1:2 (SEQ ID NO: 142)	0,00	0,00
pMON129231	P-SETit.OMT2.3-1:1:1 (SEQ ID NO: 68) L-SETit.OMT2.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 141)	0,00	0,00
pMON129232	P-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 56) L-SETit.Grcw2-1:1:1 (SEQ ID NO: 134)	0,00	0,00
pMON129233	P-SETit.Prx2-1:1:3 (SEQ ID NO: 81) L-SETit.Prx2-1:1:2 (SEQ ID NO: 155)	5,96	nd
pMON129234	P-SETit.Srp-1:1:2 (SEQ ID NO: 92) L-SETit.Srp-1:1:1 (SEQ ID NO: 163)	0,00	0,00
pMON129235	P-SETit.LaDo-1:1:2 (SEQ ID NO: 62) L-SETit.LaDo-1:1:1 (SEQ ID NO: 137)	0,00	0,00
pMON129236	P-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 27) L-SETit.Aip-1:1:1 (SEQ ID NO: 109)	0,00	0,00
pMON129237	P-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 79) L-SETit.Prx-1:1:1 (SEQ ID NO: 153)	10,66	0,00

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Raíz V3	Hoja V3
pMON129238	P-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 34) L-SETit.Cbl7-1:1:1 (SEQ ID NO: 115)	0,00	0,00
pMON129239	P-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 54) L-SETit.Fst-1:1:1 (SEQ ID NO: 132)	2,86	0,00
pMON129240	P-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 36) L-SETit.Cda-1:1:1 (SEQ ID NO: 117)	0,00	0,00
pMON129241	P-SETit.Prx3-1:1:4 (SEQ ID NO: 83) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	7,49	0,00
pMON129242	P-SETit.Prx3-1:1:3 (SEQ ID NO: 82) L-SETit.Prx3-1:1:1 (SEQ ID NO: 156)	1,90	0,00
pMON129243	P-SETit.Prx47-1:1:2 (SEQ ID NO: 84) L-SETit.Prx47-1:1:1 (SEQ ID NO: 157)	9,26	0,00
pMON129244	P-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 49) L-SETit.Eie-1:1:1 (SEQ ID NO: 129)	2,35	0,00
pMON129245	P-SETit.Omt3-1:1:3 (SEQ ID NO: 69) L-SETit.Omt3-1:1:1 (SEQ ID NO: 143)	0,00	0,00
pMON129246	P-SETit.Cys-1:1:2 (SEQ ID NO: 45) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	0,00	0,00
pMON129247	P-SETit.Cys-1:1:3 (SEQ ID NO: 46) L-SETit.Cys-1:1:1 (SEQ ID NO: 127)	0,00	0,00
pMON129249	P-SETitTip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)	34,79	0,00
pMON129250	P-SETit.Prx72-1:1:2 (SEQ ID NO: 85) L-SETit.Prx72-1:1:1 (SEQ ID NO: 158)	0,00	0,00
pMON129251	P-SETit.Prx17-1:1:2 (SEQ ID NO: 80) L-SETit.Prx17-1:1:1 (SEQ ID NO: 154)	0,00	0,00
pMON129252	P-SETit.Mt1-1:1:2 (SEQ ID NO: 63) L-SETit.Mt1 -1:1:1 (SEQ ID NO: 138)	0,00	24,92
pMON129253	P-SETit.Ali1-1:1:3 (SEQ ID NO: 31) L-SETit.Ali1-1:1:1 (SEQ ID NO: 112)	0,00	11,58
pMON129254	P-SETit.Rcc3-1:1:16 (SEQ ID NO: 91) L-SETit.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 162)	9,39	0,00
pMON129255	P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)	79,81	0,00
pMON129256	P-SETit.Tga6-1:1:2 (SEQ ID NO: 95)	6,91	0,00
pMON129257	P-SETit.25509-1:1:3 (SEQ ID NO: 23)	0,00	0,00
pMON129258	P-SETit.Grf-1:1:2 (SEQ ID NO: 57)	0,00	0,00
pMON129259	P-SETit.Omt4_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 70) L-SETit.Omt4_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 144)	0,00	0,00

Los niveles promedio más altos de expresión de GUS en las raíces de las plantas de la etapa V3 se observaron en plantas transformadas con las construcciones pMON129255 ((P-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 72) + L-SETit.Pip2-3-1:1:1 (SEQ ID NO: 146)) y pMON129249 ((P-SETit.Tip-1:1:4 (SEQ ID NO: 97) + L-SETit.Tip-1:1:1 (SEQ ID NO: 165)).

Ejemplo 5: Análisis de elementos reguladores de actina y tubulina que dirigen GUS en protoplastos de maíz

Los protoplastos de la hoja de maíz se transformaron con vectores de expresión de plantas que contienen un elemento regulador de la transcripción o un grupo de elementos de la expresión reguladora de la transcripción de prueba, que dirigen la expresión del transgén de la β-glucuronidasa (GUS), y se compararon con protoplastos de hoja en los que la expresión de GUS está dirigida por promotores constitutivos conocidos.

Células de protoplastos de maíz, derivadas del tejido de la hoja se transformaron utilizando procedimientos conocidos en la técnica con vectores de expresión de plantas para comparar la expresión de un transgén impulsado por los grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19), EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16), EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18), EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9), EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10), EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11), EXP-SETit.T ubA2-1:1:2 (SEQ ID NO:

17) y EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15) con la de promotores constitutivos conocidos. Cada grupo de elementos de expresión reguladora de la transcripción se clonó utilizando procedimientos conocidos en la técnica en un vector de expresión de plantas que se muestra en la Tabla 10 a continuación. Los vectores de expresión de plantas resultantes están compuestos por un casete de transgenes comprendido por un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, unido operativamente en 5' a una secuencia de codificación de β-glucuronidasa (GUS) (GUS-1 o GUS-3, representada por las SEQ ID NOS: 1090 y 1092, respectivamente), que están unidas operativamente en 5' a una región de terminación 3' procedente del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o el gen Hspl7 de trigo (T-Ta.Hsp17-1:1:1, SEQ ID NO: 1108).

Los plásmidos de control utilizados para la comparación se construyeron como se describió anteriormente y se componen de grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción constitutivos conocidos. El vector plásmido de control, pMON19469 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1104). El vector plásmido de control, pMON65328 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1 / I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105). El vector plásmido de control, pMON25455 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098). El vector plásmido de control, pMON122605 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107). Cada grupo de elementos reguladores de la transcripción del vector de control está unido operativamente en 5' a una secuencia codificadora de β-glucuronidasa (GUS) (GUS-1 o GUS-3), representada por las SEQ ID NOS: 1090 y 1092, respectivamente), que están unidas operativamente en 5' a una región de terminación 3' procedente del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o el gen Hsp17 de trigo (T-Ta.Hsp17-1:1:1, SEQ ID NO: 1108). Además, se proporcionan tres controles como controles para GUS de fondo y la expresión de luciferasa, un control sin ADN, un vector vacío que no está diseñado para la expresión del transgén y un vector de expresión utilizado para expresar la proteína fluorescente verde (GFP).

Tabla 10. Vectores de expresión de GUS en plantas y grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción correspondientes y promotores constituyentes, líderes e intrones, y 3' UTR utilizados para la transformación de protoplastos de hojas de maíz.

Construcción	Elementos reguladores	3' UTR
pMON136270	EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19) P-SETit.TubA3-1:1:3 (SEQ ID NO: 101) L-SETit.TubA3-1:1:1 (SEQ ID NO: 168)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136272	EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16) P-SETit.TubA2-1-1:1:3 (SEQ ID NO: 99) L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166) I-SETit.TubA2_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 176)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136275	EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18) P-SETit.TubA2-2-1:1:3 (SEQ ID NO: 100) L-SETit.TubA2-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 167)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136276	EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9) P-SETit.Act8-1:1:5 (SEQ ID NO: 24) L-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 106) I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172) L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136277	EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10) P-SETit.Act8-1:1:6 (SEQ ID NO: 25) L-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 106) I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172) L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136278	EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11) P-SETit.Act8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 26) L-SETit.Act8-1:1:4 (SEQ ID NO: 108) I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172) L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136279	EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17) P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98) L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166)	T-AGRtu.nos-1:1:13
pMON136280	EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15) P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98) L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166) I-SETit.TubA2_1 -1:1:2 (SEQ ID NO: 176)	T-AGRtu.nos-1:1:13

El vector de transformación de plantas, pMON136270 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la

transcripción, EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19), que además comprende el elemento promotor, P-SETit.TubA3-1:1:3 (SEQ ID NO: 101), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA3-1:1:1 (SEQ ID NO: 168). El vector de transformación de plantas, pMON136272 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16), que además comprende el elemento promotor, P-SETit.TubA2-1-1:1:3 (SEQ ID NO: 99), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.TubA2_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 176). El vector de transformación de plantas, pMON136275 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18), que además comprende el elemento promotor, P-SETit.TubA2-2-1:1:3 (SEQ ID NO: 100), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA2-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 167). El vector de transformación de plantas, pMON136276 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9), que además comprende el elemento promotor, P-SETit.Act8-1:1:5 (SEQ ID NO: 24), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 106), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107). El vector de transformación de plantas, pMON136277 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10), que además comprende el elemento promotor, P-SETit.Act8-1:1:6 (SEQ ID NO: 25), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 106), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107). El vector de transformación de plantas, pMON136278 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11), que además comprende el elemento promotor, P-SETit.Act8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 26), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:4 (SEQ ID NO: 108), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Act8-1:1:2 (SEQ ID NO: 172), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Act8-1:1:3 (SEQ ID NO: 107). El vector de transformación de plantas, pMON136279 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17), que además comprende el elemento promotor, P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166). El vector de transformación de plantas, pMON136280 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15), que además comprende el elemento promotor, P-SETit.TubA2-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 98), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.TubA2-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 166), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.TubA2_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 176).

Dos plásmidos, para su uso en la transformación simultánea y normalización de datos, se construyen también usando procedimientos conocidos en la materia. Cada plásmido contiene una secuencia de codificación específica de la luciferasa que está dirigida por un grupo constitutivo de elementos de expresión reguladores de la transcripción. El vector de planta, pMON19437 está compuesto por un casete de transgenes comprendido por un promotor constitutivo (EXP-CaMV.35S-enh, SEQ ID NO: 1095), unido operativamente en 5' a un intrón, (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga *(Photinus pyralis)* (LUCIFERASA:1:3, SEQ ID NO: 1109), unido operativamente en 5' a una región de terminación en 3' del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). El vector de planta, pMON63934 está compuesto por un casete de transgenes comprendido por un grupo constitutivo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, SEQ ID NO: 1106), unido operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de pensamiento de mar *(Renilla reniformis)* (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID NO: 1110), unido operativamente en 5' a una región de terminación en 3' del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088).

Se transformaron los protoplastos de la hoja de maíz utilizando un procedimiento de transformación basado en PEG, similar a los conocidos en la técnica. Las células de protoplastos se transforman con una preparación de ADN que consta de cantidades equimolares de los dos plásmidos de expresión de luciferasa, pMON19437 y pMON63934 y uno de los plásmidos de ensayo y se incubaron durante la noche en la oscuridad total. Después de la incubación, las células se enjuagaron, se resuspendieron y se lisaron. Las mediciones de GUS y luciferasa se realizaron utilizando alícuotas de cada preparación de lisis. Esencialmente, las células de protoplastos transformados recogidas se lisaron en un tampón de lisis pasivo 5X (Promega). Después de permitir la lisis, las alícuotas de la preparación lisada se colocaron en dos bandejas diferentes de pocillos pequeños. Una bandeja se utilizó para las mediciones de GUS. Para el análisis cuantitativo de la expresión de GUS, la proteína total se extrajo de la preparación de lisis. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metileumbeliferil-β-D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se midió con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm utilizando un Fluoromax-3 con Micromax Reader, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm. Los valores de GUS se expresan como pmol de proteína 4-MU por minuto por miligramo de proteína (pmol 4-MU $min^{-1}mg^{-1}$ de proteína).

La segunda bandeja se utilizó para realizar un ensayo de luciferasa dual utilizando el sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual (Promega, Madison, WI). Todos los reactivos de detección de la luciferasa se prepararon según lo descrito por el fabricante y los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante (véase, por ejemplo, Promega Notes Magazine, N.º: 57, 1996, p.02). Se añadió reactivo de luciferasa de luciérnaga (LARII) a cada

muestra y se registró el ensayo de la actividad de luciferasa de luciérnaga. Al finalizar el ensayo de luciferasa de luciérnaga, se inactivó la luminiscencia de la luciérnaga y se activó la luminiscencia de la luciferasa de *Renilla reniformis* simultáneamente, añadiendo el reactivo Stop & Glo ™ a la muestra. La medición de la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis* se registró después de la activación de la luciferasa de *Renilla*. Se realizaron una o dos transformaciones para cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción y los valores medios de expresión para cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción se determinaron a partir de varias muestras de cada experimento de transformación. Las mediciones de las muestras se realizaron utilizando cuatro réplicas de cada transformación de la construcción del grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, o alternativamente, tres réplicas de cada construcción de grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción de prueba por uno de dos experimentos de transformación. Los niveles medios de expresión de GUS y luciferasa se proporcionan en las Tablas 11 y 12. los valores de luciferasa de luciérnaga se proporcionan en la columna marcada con "FLuc" y los valores de luciferasa de *Renilla* se proporcionan en la columna marcada con "RLuc".

Para comparar la actividad relativa de cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, los valores de GUS se expresaron como una relación de la expresión de GUS media a la actividad de luciferasa media y se normalizaron con respecto a los niveles de expresión observados para los grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098) y EXP-Os.TubA-3: 1: 1 (SEQ ID NO: 1107). La Tabla 11 a continuación muestra las relaciones medias GUS/Rluc normalizadas con respecto a EXP-Os.Act1:1: y EXP-Os.TubA-3:1:1 expresión en protoplastos de maíz.

Tabla 11. Expresión media del pliegue de GUS/Rluc en relación con la expresión EXP-Os.TubA-3:1:1 en células de protoplastos de hojas de maíz.

Construcción	Grupo de elementos reguladores de la transcripción	Media de Gus/RLuc	Media de Gus/Rluc normalizada con respecto a EXP-Os.TubA-3:1:1	GUS/Rluc normalizada con respecto a EXP-Os.Act1:1:1
pMON19469	EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102)	2,640	2,718	1,054
pMON65328	EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1 / I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105)	3,213	3,307	1,283
pMON25455	EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098)	2,504	2,578	1,000
pMON122605	EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107)	0,971	1,000	0,388
pMON136270	EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19)	1,909	1,965	0,762
pMON136272	EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16)	0,144	0,148	0,057
pMON136275	EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18)	0,001	0,001	0,000
pMON136276	EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9)	0,353	0,364	0,141
pMON136277	EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10)	0,271	0,279	0,108
pMON136278	EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11)	0,005	0,005	0,002
pMON136279	EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17)	0,003	0,004	0,001
pMON136280	EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15)	0,155	0,159	0,062

Tabla 12. Expresión media de GUS/Fluc en relación con la expresión de EXP-Os.TubA-3:1:1 en células de protoplastos de hojas de maíz.

Construcción	Grupo de elementos reguladores de la transcripción	Media de Gus/FLuc	Gus/Fluc normalizada con respecto a EXP-Os.TubA-3: 1: 1	GUS/Fluc normalizada con respecto a EXP-Os.Act1:1:1
pMON19469	EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102)	21,580	18,072	2,521
pMON65328	EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1 / I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105)	29,566	24,759	3,454
pMON25455	EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098)	8,559	7,167	1,000
pMON122605	EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107)	1,194	1,000	0,140
pMON136270	EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19)	2,222	1,861	0,260
pMON136272	EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16)	0,302	0,253	0,035
pMON136275	EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18)	0,002	0,002	0,000
pMON136276	EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9)	0,678	0,568	0,079
pMON136277	EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10)	0,550	0,460	0,064
pMON136278	EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11)	0,009	0,008	0,001
pMON136279	EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17)	0,004	0,004	0,001
pMON136280	EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15)	0,378	0,317	0,044

Las relaciones GUS/Rluc y GUS/Fluc normalizadas que se proporcionan en las Tablas 11 y 12 proporcionan evidencia de que la mayoría de los elementos de expresión son capaces de impulsar la expresión de GUS en protoplastos de hojas de maíz. Las construcciones, pMON136275 (EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18)) y pMON136279 (EXP-SETit.T ubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17)) demostraron la menor cantidad de expresión. La construcción, pMON136270 (EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19)) proporcionó el nivel más alto de expresión entre los elementos de prueba en relación con los controles constitutivos.

Ejemplo 6: Análisis de elementos reguladores de actina y tubulina que impulsan GUS en protoplastos de trigo

Los protoplastos de la hoja de trigo se transformaron con vectores de expresión de plantas que contenían un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción de prueba, que dirigen la expresión del transgén de la β-glucuronidasa (GUS), y se compararon con protoplastos de hoja en los que la expresión de GUS está dirigida por promotores constitutivos conocidos.

Células de protoplasto de trigo, derivadas del tejido de la hoja se transformaron utilizando procedimientos de transformación basados en PEG conocidos en la técnica con vectores de expresión de plantas para comparar la expresión de un transgén impulsado por los grupos de elementos de expresión reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19), EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16), EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18), EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9), EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10), EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11), EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17) y EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15) con la de promotores constitutivos conocidos. Cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción se clonó utilizando procedimientos conocidos en la técnica en un vector de expresión de plantas que se muestra en la Tabla 10 en el ejemplo 5 anterior. Los vectores de expresión de plantas resultantes están compuestos por un casete de transgenes comprendido por un grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, unido operativamente en 5' a una secuencia de codificación de β-glucuronidasa (GUS) (GUS-1 o GUS-3, representado por las SEQ ID NOS: 1090 y 1092, respectivamente), que está unido operativamente en 5' a una región de terminación 3' derivada del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 56) o el gen Hsp17 de trigo (T-Ta.Hsp17-1:1:1, SEQ ID NO: 57).

Las construcciones de vectores plásmidos de control y las construcciones de plásmidos de control de transformación de luciferasa fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 5. Las mediciones de la actividad de GUS y luciferasa se realizaron como se describe en el ejemplo 5.

Para comparar la actividad relativa de cada grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, los valores de GUS se expresaron como una relación entre la actividad de GUS y la actividad luciferasa y se normalizaron con respecto a los niveles de expresión observados para el grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107). La Tabla 13 a continuación muestra las relaciones GUS/Rluc normalizadas con respecto a la expresión EXP-Os.TubA-3:1:1 en protoplastos de maíz.

La actividad de GUS y luciferasa se mide como se describe en el Ejemplo 2 con ensayos repetidos para determinar el nivel promedio de expresión de GUS y luciferasa en células de protoplastos de trigo. Los valores medios de GUS se compararon con los valores medios de luciferasa y se normalizaron con respecto a la expresión observada en las células de protoplastos de trigo transformadas con un vector de expresión GUS en el que GUS está impulsado por el grupo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 65) para determinar la actividad relativa del pliegue de la expresión de GUS impulsada por los grupos de elementos de la expresión reguladores de la transcripción, EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19), EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16), EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18), EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9), EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10), EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11), EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17) y EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15).

Los niveles medios de expresión de GUS y luciferasa se proporcionan en la Tabla 13. Los valores de luciferasa de *Renilla* se proporcionan en la columna etiquetada "Rluc".

Tabla 13. Expresión media del pliegue de GUS/Rluc relativa a la expresión EXP-Os.TubA-3:1:1 en células de protoplastos de hojas de maíz.

Construcción	Grupo de elementos reguladores de la transcripción	Media de Gus/RLuc	GUS/Rluc normalizada con respecto a TubA-3:1:1	GUS/Rluc normalizada con respecto a EXP-Os.Act1:1:1
pMON19469	EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102)	12,540	22,423	1,030
pMON65328	EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb 1 / I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105)	16,371	29,274	1,345
pMON25455	EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098)	12,175	21,770	1,000
pMON122605	EXP-Os.TubA-3:1:1 (SEQ ID NO: 1107)	0,559	1,000	0,046
pMON136270	EXP-SETit.TubA3:1:3 (SEQ ID NO: 19)	2,300	4,112	0,189
pMON136272	EXP-SETit.TubA2:1:3 (SEQ ID NO: 16)	0,933	1,669	0,077
pMON136275	EXP-SETit.TubA2-2:1:1 (SEQ ID NO: 18)	0,028	0,051	0,002
pMON136276	EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9)	1,606	2,873	0,132
pMON136277	EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10)	1,281	2,291	0,105
pMON136278	EXP-SETit.Act8:c (SEQ ID NO: 11)	0,051	0,091	0,004
pMON136279	EXP-SETit.TubA2-1:1:2 (SEQ ID NO: 17)	0,037	0,066	0,003
pMON136280	EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15)	1,516	2,710	0,125

El nivel más alto de expresión de GUS en protoplasto de trigo se observó en las células transformadas con las construcciones pMON136270 (EXP-SETit.TubA3: 1: 3 (SEQ ID NO: 19)); pMON136276 (EXP-SETit.Act8:1:1 (SEQ ID NO: 9)); pMON136277 (EXP-SETit.Act8:1:2 (SEQ ID NO: 10)) y pMON136280 (EXP-SETit.TubA2:1:1 (SEQ ID NO: 15)).

Ejemplo 7: Identificación de elementos reguladores de la transcripción utilizados para la expresión de

semillas.

Los elementos reguladores de la transcripción que comprenden promotores, líderes, intrones y 3' UTR útiles para proporcionar la expresión de un transgén en semillas y tejidos reproductivos de plantas se identificaron basándose en la expresión de marcadores de secuencia expresados (EST) en bibliotecas de ADNc preparadas a partir de ARN mensajero aislado de semillas, flores y otros tejidos obtenidos de panizo común *(Setaria italica* (L.) Beauv). Las bibliotecas de ADNc se fabrican a partir de tejidos aislados de *S. italica* utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica a partir de tejidos de flores a los 0, 4, 7, 14, 21 y 31 días después de la polinización (DAP), así como a la hoja y la raíz. Los ADNc resultantes se secuencian utilizando diversos procedimientos de secuenciación conocidos en la técnica. Los EST resultantes se ensamblan en grupos utilizando software bioinformático tal como clc_ref_assemble_complete versión 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). Se determinó la abundancia de transcritos de cada grupo contando el número de lecturas de ADNc para cada grupo. La Tabla 14 a continuación muestra los ensamblajes de grupos que se han producido utilizando ADNc de bibliotecas preparadas de tejido de *S. italica* aislado de la hoja, raíz y flor a los 0, 4, 7, 14, 21 y 31 días después de la polinización (DAP) que demuestran la expresión en ventanas específicas de la semilla en desarrollo y no se observaron o se observaron mínimamente en la hoja y la raíz. Cada grupo se anotó utilizando procedimientos de análisis bioinformáticos como de nucleótidos y la proteína BLAST contra datos públicos y de propiedad de genes expresados en monocotiledóneas y dicotiledóneas. En muchos casos, no se identificó un homólogo en el grupo y se indica en la Tabla 14 como "No homólogo".

Tabla 14. Agrupaciones y anotaciones EST de panizo común.

ID de grupo	SEQ ID NO:	Comentario
SETIT-28JUL09-CLUS10381_5	925	proteína hipotética SORBIDRAFT_03 g000770
SETIT-28JUL09-CLUS101265_2	926	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS6475_-5	927	Supuesta proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS1019870_1	928	Supuesta proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS680767_-4	929	Transportador plastidial ADP-glucosa
SETIT-28JUL09-CLUS343678_3	930	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS7568_3	931	No homólogo
SETIT -28JUL09-CLUS771450_2	932	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1164825_1	933	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS 1406_-46	934	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1165324_1	935	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1140244_1	936	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS153853_-4	937	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS 19108_-4	938	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS23464_-6	939	Supuesta proteína no caracterizada OS = Oryza
SETIT-28JUL09-CLUS1180442_1	940	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS675196_13	941	Proteína de almacenamiento de semillas tipo zeína (Fragmento)
SETIT-28JUL09-CLUS83_2	942	Sintasa de almidón unido granulado
SETIT-28JUL09-CLUS16759_4	943	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS5145_3	944	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1193060_1	945	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1187352_1	946	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS733_4	947	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS4206_-30	948	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS4114_2	949	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS674506_2	950	Globulina-1 S Alelo
SETIT-28JUL09-CLUS674506_3	951	Proteína de almacenamiento de embriones similar a Vicilina OS = Zea
SETIT-28JUL09-CLUS53110_1	952	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS2505_8	953	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS2888_5	954	Supuesta proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS2219_3	955	No homólogo

(continuación)

ID de grupo	SEQ ID NO:	Comentario
SETIT-28JUL09-CLUS12533_-3	956	Nucleósido difosfato quinasa
SETIT-28JUL09-CLUS12533_-6	957	Nucleósido difosfato quinasa
SETIT-28JUL09-CLUS2300_3	958	proteína hipotética SORBIDRAFT_01 g043300
SETIT-28JUL09-CLUS696559_1	959	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS681829_1	960	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS680981_1	961	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS2305_6	962	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS685018_1	963	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS12299_7	964	Poliproteína (fragmento); Ubiquitina 5
SETIT-28JUL09-CLUS295335_-4	965	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS206694_6	966	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1102871_1	967	proteína hipotética SORBIDRAFT_03 g001990
SETIT-28JUL09-CLUS1104561_1	968	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS2723_-8	969	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS387500_3	970	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS6331_-8	971	proteína hipotética SORBIDRAFT_03 g007310
SETIT-28JUL09-CLUS1103723_1	972	proteína Os08g0402800
SETIT-28JUL09-CLUS482_-8	973	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1096748_1	974	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1127439_1	975	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1115180_1	976	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1108597_1	977	Supuesta hidrolasa OS = Oryza sativa subsp.
SETIT-28JUL09-CLUS96386_-2	978	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS373929_-2	979	proteína hipotética SORBIDRAFT_09 g021920
SETIT-28JUL09-CLUS1090880_1	980	Protección de la proteína de los telómeros 1a
SETIT-28JUL09-CLUS1130991_1	981	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1131180_1	982	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS5112_3	983	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1020178_2	984	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1437_14	985	APG proteína rica en prolina específica de antera
SETIT-28JUL09-CLUS4707_5	986	Supuesta proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS1130710_1	987	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS880479_1	988	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS879579_1	989	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS17065_3	990	Supuesta proteína no caracterizada OS = Zea mays
SETIT-28JUL09-CLUS1703_5	991	proteína hipotética SORBIDRAFT_01 g038035
SETIT-28JUL09-CLUS878855_1	992	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS35651_8	993	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS533810_3	994	Supuesta proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS888639_1	995	proteína hipotética SORBIDRAFT_08 g019910
SETIT-28JUL09-CLUS8608_2	996	Supuesta proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS48534_2	997	proteína hipotética SORBIDRAFT_04 g001090
SETIT-28JUL09-CLUS8620_17	998	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS31891_4	999	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS6173_1	1000	proteína Os09g0539100
SETIT-28JUL09-CLUS884159_1	1001	proteína hipotética SORBIDRAFT_05 g019890
SETIT-28JUL09-CLUS112639_5	1002	No homólogo

(continuación)

ID de grupo	SEQ ID NO:	Comentario
SETIT-28JUL09-CLUS886862_1	1003	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS52311_2	1004	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS886157_1	1005	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS4920_5	1006	Fosfatidilinositol 4-quinasa OS = Oryza
SETIT-28JUL09-CLUS1697_9	1007	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS18000_5	1008	proteína hipotética SORBIDRAFT_10 g022890
SETIT-28JUL09-CLUS10981_4	1009	6-fosfofructoquinasa
SETIT-28JUL09-CLUS880709_1	1010	Sitio ribosómico de ARN apurínico específico de liasa
SETIT-28JUL09-CLUS882664_1	1011	proteína Os10 g0374600
SETIT-28JUL09-CLUS19159_2	1012	proteína hipotética SORBIDRAFT_06 g017240
SETIT-28JUL09-CLUS5475_-2	1013	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS1194621_1	1014	alfa caneína 5 de 22 kD OS = Saccharum officinarum; Proteína de almacenamiento de semillas
SETIT-28JUL09-CLUS675196_9	1015	Proteína de almacenamiento de semillas tipo zeína (Fragmento)
SETIT-28JUL09-CLUS719393_1	1016	delta caneína de 10kD; Proteína delta de almacenamiento de zeína
SETIT-28JUL09-CLUS722936_1	1017	delta caneína de 10kD
SETIT-28JUL09-CLUS722936_-2	1018	delta caneína de 10kD
SETIT-28JUL09-CLUS684877_1	1019	Alfa kafirina OS = sorgo bicolor
SETIT-28JUL09-CLUS675196_-2	1020	Proteína de almacenamiento de semillas tipo zeína (Fragmento); Alfa-coixina
SETIT-28JUL09-CLUS691558_2	1021	penisetina de 27 kDa
SETIT-28JUL09-CLUS764553_1	1022	penisetina de 22 kDa OS = Pennisetum americanum
SETIT-28JUL09-CLUS675787_1	1023	penisetina de 21 kDa OS = Pennisetum americanum; Alfa-coixina
SETIT-28JUL09-CLUS691558_-3	1024	penisetina de 27 kDa
SETIT-28JUL09-CLUS675196_11	1025	penisetina de 22 kDa OS = Pennisetum americanum
SETIT-28JUL09-CLUS722936_-3	1026	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS69557_1	1027	Supuesta proteína no caracterizada
SETIT-28JUL09-CLUS681682_1	1028	Delta-coixina OS = Coix lachryma-jobi PE = 2 SV = 1; Prolamina
SETIT-28JUL09-CLUS675531_1	1029	N-metiltransferasa
SETIT-28JUL09-CLUS674096_1	1030	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS674121_1	1031	Prolamina
SETIT-28JUL09-CLUS675389_2	1032	No homólogo
SETIT-28JUL09-CLUS677324_1	1033	proteína hipotética SORBIDRAFT_01 g012345

Un análisis de la expresión de ADNc para cada grupo presentado en la Tabla 14 se proporciona en la Tabla 15 a continuación. Para tejido de flores, Se realizaron los siguientes números totales de lecturas de EST; flor 0 DAP, 251341; flor 4 DAP, 39277; flor 7 DAP, 34330; flor 14 DAP, 34920; flor 21 DAP, 42321; flor 31 DAP, 257327. Para tejido foliar y radicular, Se realizaron los siguientes números totales de lecturas de EST; hojas, 478570 y raíz, 434180.

Tabla 15. Recuento de ADNc expresados correspondientes a grupos EST.

Anotación de grupo	DAP 0	DAP 4	DAP 7	DAP 14	DAP 21	DAP 31	Hojas	Raíz	Ventana de expresión y órgano
SETIT-28JUL09-CLUS10381_5	17	331	0	0	0	0	0	0	0-7
SETIT-28JUL09-CLUS101265_2	12	152	87	0	0	0	0	0	0-7

(continuación)

Anotación de grupo	DAP 0	DAP 4	DAP 7	DAP 14	DAP 21	DAP 31	Hojas	Raíz	Ventana de expresión y órgano
SETIT-28JUL09-CLUS6475_-5	11	143	82	0	0	0	0	0	0-7
SETIT-28JUL09-CLUS1019870_1	14	119	34	0	0	0	0	0	0-7
SETIT-28JUL09-CLUS680767_-4	0	0	0	239	100	16	0	0	14-31
SETIT-28JUL09-CLUS343678_3	0	0	0	491	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS7568_3	0	0	0	486	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS771450_2	0	0	0	481	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS1164825_1	0	0	0	419	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS1406_-46	0	0	0	324	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS1165324_1	0	0	0	323	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS1140244_1	0	0	0	310	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS153853_-4	0	0	0	304	0	0	0	0	14
SETIT-28JUL09-CLUS19108_-4	0	0	0	138	115	0	0	0	14-21
SETIT-28JUL09-CLUS23464_-6	0	0	0	132	111	0	0	0	14-21
SETIT-28JUL09-CLUS1180442_-1	0	0	0	294	247	0	0	0	14-21
SETIT-28JUL09-CLUS675196_13	0	0	0	169	142	0	0	0	14-21
SETIT-28JUL09-CLUS83_2	0	0	0	111	187	15	0	0	14-31
SETIT-28JUL09-CLUS16759_4	0	0	0	0	525	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS5145_3	0	0	0	0	448	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS1193060_1	0	0	0	0	390	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS1187352_1	0	0	0	0	385	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS733_4	0	0	0	0	356	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS4206_-30	0	0	0	0	352	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS4114_2	0	0	0	0	324	0	0	0	21
SETIT-28JUL09-CLUS674506_2	0	0	0	0	772	12	0	0	21-31
SETIT-28JUL09-CLUS674506_3	0	0	0	0	545	9	0	0	21-31
SETIT-28JUL09-CLUS53110_1	0	0	0	0	0	167	0	9	31
SETIT-28JUL09-CLUS2505_8	0	0	0	0	0	547	0	0	31

(continuación)

Anotación de grupo	DAP 0	DAP 4	DAP 7	DAP 14	DAP 21	DAP 31	Hojas	Raíz	Ventana de expresión y órgano
SETIT-28JUL09-CLUS2888_5	0	0	0	0	0	475	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS2219_3	0	0	0	0	0	369	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS12533_-3	0	0	0	0	0	363	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS12533_-6	0	0	0	0	0	311	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS2300_3	0	0	0	0	0	276	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS696559_1	0	0	0	0	0	250	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS681829_1	0	0	0	0	0	246	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS680981_1	0	0	0	0	0	235	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS2305_6	0	0	0	0	0	220	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS685018_1	0	0	0	0	0	217	0	0	31
SETIT-28JUL09-CLUS12299_7	0	295	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS295335_-4	0	569	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS206694_6	0	387	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS1102871_1	0	350	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS1104561_1	0	348	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS2723_-8	0	338	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS387500_3	0	330	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS6331_-8	0	323	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS1103723_1	0	302	0	0	0	0	0	0	4
SETIT-28JUL09-CLUS482_-8	0	90	208	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1096748_1	0	112	129	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1127439_1	0	110	127	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1115180_1	0	104	120	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1108597_1	0	98	113	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS96386_-2	0	96	110	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS373929_-2	0	91	104	0	0	0	0	0	4-7
SETIT-28JUL09-CLUS1090880_1	0	90	104	0	0	0	0	0	4-7

(continuación)

Anotación de grupo	DAP 0	DAP 4	DAP 7	DAP 14	DAP 21	DAP 31	Hojas	Raíz	Ventana de expresión y órgano
SETIT-28JUL09-CLUS1130991_1	0	0	562	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS1131180_1	0	0	495	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS5112_3	0	0	484	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS1020178_2	0	0	471	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS1437_14	0	0	461	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS4707_5	0	0	446	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS1130710_1	0	0	427	0	0	0	0	0	7
SETIT-28JUL09-CLUS880479_1	549	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS879579_1	405	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS17065_3	382	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETTT-28JUL09-CLUS1703_5	287	0	0	0	0	0	0	8	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS878855_1	280	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS35651_8	225	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS533810_3	203	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS888639_1	198	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS8608_2	196	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS48534_2	175	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS8620_17	172	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETTT-28JUL09-CLUS31891_4	171	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS6173_1	159	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS884159_1	155	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS112639_5	149	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS886862_1	144	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS52311_2	138	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS886157_1	136	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS4920_5	133	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS1697_9	132	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo

(continuación)

Anotación de grupo	DAP 0	DAP 4	DAP 7	DAP 14	DAP 21	DAP 31	Hojas	Raíz	Ventana de expresión y órgano
SETIT-28JUL09-CLUS18000_5	129	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS10981_4	129	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS880709_1	129	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS882664_1	128	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS19159_2	128	0	0	0	0	0	0	0	Polen de óvulo
SETIT-28JUL09-CLUS5475_-2	0	0	1721	12386	34684	11782	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS1194621_1	0	0	1386	9267	23798	8799	0	0	Semillas
SETTT-28JUL09-CLUS675196_9	0	0	1232	17098	22397	17083	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS719393_1	0	0	1184	13872	15107	13799	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS722936_1	0	0	1184	23792	30815	25296	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS722936_-2	0	0	1179	20955	22818	17587	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS684877_1	0	58	1003	5775	18118	5089	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS675196_-2	0	0	955	27322	31248	23018	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS691558_2	0	0	878	18204	29860	18448	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS764553_1	0	0	771	10897	12055	6685	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS675787_1	0	48	547	11309	12229	11428	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS691558_-3	0	0	511	7149	9793	4697	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS675196_11	0	0	478	5648	6182	5752	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS722936_-3	0	0	255	4537	4906	5131	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS695757_1	0	0	240	2803	3438	2313	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS681682_1	0	0	210	5982	6290	5382	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS675531_1	0	58	178	573	346	458	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS674096_1	0	0	114	1648	2816	1837	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS675389_2	0	0	102	6728	7852	7164	0	0	Semillas
SETIT-28JUL09-CLUS677324_1	0	56	65	133	74	59	0	0	Semillas

Como se puede ver en la Tabla 15 anterior, muchos de los grupos identificados demuestran expresión en ventanas específicas del desarrollo de semillas; a 0 DAP en la que se infiere que la expresión está en el óvulo y el polen, o durante la ventana de desarrollo de la semilla de 4 a 31 DAP. Los grupos de ADNc identificados se utilizaron para

diseñar cebadores, que luego se usaron con las bibliotecas de GenomeWalker ™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 5' de la secuencia de ADN genómica correspondiente. En el caso de promotores líderes e intrones, esta región clonada contenía el regulador transitorio en 5', 5' UTR y si está presente, la secuencia de intrones en la dirección 5' de la región codificadora de proteínas para cada gen de *S. italica.* Utilizando esta secuencia, los elementos reguladores se identificaron bioinformáticamente dentro de la región 5' de cada gen. Se utilizó el análisis bioinformático para identificar el sitio de inicio de la transcripción (SST) y cualquier bidireccionalidad, intrones o secuencia codificante en dirección 5' presente en la secuencia. Utilizando los resultados de este análisis, los elementos reguladores se definieron dentro de la secuencia 5' en dirección 5' de la secuencia de codificación del gen. A continuación se diseñaron cebadores para amplificar los elementos reguladores. Se amplificó la molécula de ADN correspondiente a cada elemento regulador utilizando condiciones convencionales de la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores que contienen sitios de enzimas de restricción únicos y ADN genómico aislado de *S. italica.* Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron en un vector de expresión en plantas básico usando digestión con enzimas de restricción convencionales de sitios de restricción compatibles y procedimientos de ligadura del ADN. En algunos casos, La alta identidad de secuencia entre algunos líderes proporcionó el descubrimiento de elementos reguladores a partir de genes homólogos. Los grupos de elementos reguladores transcripcionales resultantes, promotores, líderes e intrones identificados a través de este análisis se presentan en la Tabla 16 a continuación:

Tabla 16. Grupos de elementos reguladores de la transcripción (EXP), Promotores (P), líderes (L) e intrones (I) identificados mediante el análisis de expresión.

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
EXP-SETit.CLUS 120796-1	12	Grupo 120796-1
EXP-SETit.CLUS19108	13	Grupo 19108
EXP-SETit.Ubq5	22	Ubiquitina 5
P-SETit.Alc1-1:1:1	28	Alfa-coixina
P-SETit.Alc1-1:1:2	29	Alfa-coixina
P-SETit.Alc2-1:1:2	30	Alfa-coixina
P-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1	37	Grupo 1164825-1
P-SETit.CLUS 1165324-1:1:1	38	Grupo 1165324-1
P-SETit.CLUS120796-1-1:1:1	39	Grupo 120796-1
P-SETit.CLUS 19108-1:1:2	40	Grupo 19108
P-SETit.CLUS882664-1-1:1:2	41	Grupo 882664-1
P-SETit.Dzs-1:1:4	47	Proteína delta de almacenamiento de zeína
P-SETit.Dzs-1:1:5	48	Proteína delta de almacenamiento de zeína
P-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:2	50	Grupo 675389-2
P-SETit.FM54-1:1:2	52	Grupo 1102871_1
P-SETit.FM63-1:1:2	53	Grupo 1019870_1
P-SETit.Pro 1-1:1:2	77	Prolamina
P-SETit.Pro2-1:1:3	78	Prolamina
P-SETit.Ssp1-1:1:1	93	Proteína de almacenamiento de semillas
P-SETit.Ssp1-1:1:2	94	Proteína de almacenamiento de semillas
P-SETit.Ubq5-1:1:2	104	Ubiquitina 5
L-SETit.Alc1-1:1:1	110	Alfa-coixina
L-SETit.Alc2-1:1:1	111	Alfa-coixina
L-SETit.CLUS 1164825-1-1:1:1	118	Grupo 1164825-1
L-SETit.CLUS120796-1-1:1:1	119	Grupo 120796-1
L-SETit.CLUS 120796-1-1:1:2	120	Grupo 120796-1
L-SETit.CLUS19108-1:1:1	121	Grupo 19108
L-SETit.CLUS19108-1:1:2	122	Grupo 19108
L-SETit.CLUS882664-1-1:1:1	123	Grupo 882664-1
L-SETit.Dzs-1:1:1	128	Proteína delta de almacenamiento de zeína
L-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:1	130	Grupo 675389-2
L-SETit.Pro1-1:1:1	151	Prolamina
L-SETit.Pro2-1:1:2	152	Prolamina

(continuación)

Comentario	SEQ ID NO:	Descripción
L-SETitSsp1-1:1:1	164	Proteína de almacenamiento de semillas
L-SETit.Ubq5-1:1:1	170	Ubiquitina 5
I-SETit.CLUS 120796-1-1:1:1	173	Grupo 120796-1
I-SETit.CLUS19108-1:1:1	174	Grupo 19108
I-SETit.Ubq5-1:1:2	178	Ubiquitina 5

En algunos ejemplos, El sitio de inicio de la transcripción no pudo ser identificado. Los elementos reguladores de la transcripción, P-SETit.FM54-1:1:2 (SEQ ID NO: 52), P-SETit.FM63-1:1:2 (SEQ ID NO: 53) y P-SETit.CLUS1165324-1:1:1 (SEQ ID NO: 38) puede comprender además un elemento promotor unido operativamente a un elemento líder o fragmento de un elemento líder.

Ejemplo 8: Análisis de elementos reguladores de semillas que dirigen GUS en tejidos de maíz bombardeados.

El tejido de las semillas, la raíz y la hoja aislados de las plantas de maíz se bombardea con vectores de control y expresión de GUS de la planta para determinar la capacidad de los elementos reguladores de la transcripción derivados de *Setaria italica* para dirigir la expresión de un transgén, GUS.

Los tejidos de la planta de maíz se transformaron con las construcciones de expresión de GUS de la planta utilizando un bombardeo de partículas, enumerados en la Tabla 17, a continuación. Los elementos reguladores presentados en el ejemplo 7 se clonaron en un vector de expresión de planta básico utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Los vectores de expresión de las plantas resultantes contienen una región del borde derecho de *Agrobacterium tumefaciens*, un primer casete del transgén para probar el elemento regulador o un elemento regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays (I-Zm.DnaK-1:1:1, SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de la β-glucuronidasa (GUS) que tiene un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091), unida operativamente a la región de terminación 3 'del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por grupo del elemento regulador de la transcripción de la Actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098), y una región límite izquierda de *A. tumefaciens.* Los plásmidos resultantes, pMON117992, pMON117993, pMON117994, pMON117995, pMON117996, pMON117997, pMON117998, pMON117999, pMON130551, pMON140500, pMON140501, pMON140502, pMON140503, pMON140504, pMON140505, pMON140506, pMON140507 y pMON140508 se utilizaron para transformar el tejido de la planta de maíz utilizando el bombardeo de partículas.

Tabla 17. Construcciones de transformación binaria de plantas y elementos reguladores.

Construcción	Elementos reguladores	Grupo de referencia
pMON117992	P-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 50) L-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 130)	SETIT-28Jul09-CLUS675389_2
pMON117993	P-SETit.Pro1-1:1:2 (SEQ ID NO: 77) L-SETit.Pro1-1:1:1 (SEQ ID NO: 151)	SETIT-28Jul09-CLUS674121_1
pMON117994	P-SETit.Pro2-1:1:3 (SEQ ID NO: 78) L-SETit.Pro2-1:1:2 (SEQ ID NO: 152)	SETIT-28Jul09-CLUS681682_1
pMON117995	P-SETit.CLUS882664-1-1:1:2 (SEQ ID NO:41) L-SETit.CLUS882664-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 123)	SETIT-28 Jul09-CLUS882664_1
pMON117996	EXP-SETit.CLUS19108 (SEQ ID NO: 13) P-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 40) L-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 122) I-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 174) L-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 121)	SETIT-28Jul09-CLUS 19108_-4
pMON117997	P-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 28) L-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 110)	SETIT-28Jul09-CLUS675196_-2
pMON117998	P-SETit.Alc2-1:1:2 (SEQ ID NO: 30) L-SETit.Alc2-1:1:1 (SEQ ID NO: 111)	SETIT-28Jul09-CLUS675787_1
pMON117999	P-SETitDzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)	SETIT-28Iul09-CLUS719393_1
pMON130551	P-SETit.Alc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29) L-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 110)	SETIT-28Jul09-CLUS675196_-2

(continuación)

Construcción	Elementos reguladores	Grupo de referencia
pMON140500	P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)	SETIT-28Jul09-CLUS719393_1
pMON140501	P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)	SETIT-28Jul09-CLUS1194621_1
pMON140502	P-SETit.Ssp1-1:1:2 (SEQ ID NO: 94) L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)	SETIT-28Ju109-CLUS1194621_1
pMON140503	EXP-SETit.CLUS120796-1 (SEQ ID NO: 12) P-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 39) L-SETit.CLUS 120796-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 120) I-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 173) L-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 119)	SETIT-28Jul09-CLUS2300_3
pMON140504	P-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 37) L-SETit.CLUS 1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 118)	SETIT-28Jul09-CLUS1164825_1
pMON140505	EXP-SETit.Ubq5 (SEQ ID NO: 22) P-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104) L-SETit.Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170) I-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178)	SETIT-28Jul09-CLUS12299_7
pMON140506	P-SETit.FM54-1:1:2 (SEQ ID NO: 52)	SETIT-28Jul09-CLUS1102871_1
pMON140507	P-SETit.FM63-1:1:2 (SEQ ID NO: 53)	SETIT-28Jul09-CLUS1019870_1
pMON140508	P-SETit.CLUS1165324-1:1:1 (SEQ ID NO: 38)	SETIT-28Jul09-CLUS 1165324_1

El vector de transformación de plantas, pMON117992 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 50), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:1 (SEQ ID NO:130). El vector de transformación de plantas, pMON117993 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Prol-1:1:2 (SEQ ID NO: 77), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETitPro1-1:1:1 (SEQ ID NO: 151). El vector de transformación de plantas, pMON117994 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Pro2-1:1:3 (SEQ ID NO: 78), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Pro2-1:1:2 (SEQ ID NO: 152). El vector de transformación de plantas, pMON117995 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.CLUS882664-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 41), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CLUS882664-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 123). El vector de transformación de plantas, pMON117996 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.CLUS19108 (SEQ ID NO: 13), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 40), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 122), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 174), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 121). El vector de transformación de plantas, pMON117997 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Alcl-1:1:1 (SEQ ID NO: 28), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Alc1-1:1:1 (SEQ ID NO: 110). El vector de transformación de plantas, pMON117998 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Alc2-1:1:2 (SEQ ID NO: 30), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Alc2-1:1:1 (SEQ ID NO: 111). El vector de transformación de plantas, pMON117999 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128). El vector de transformación de plantas, pMON130551 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Alc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Alcl-1:1:1 (SEQ ID NO: 110). El vector de transformación de plantas, pMON140500 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128). El vector de transformación de plantas, pMON140501 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Sspl-1:1:1 (SEQ ID NO: 93), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164). El vector de transformación de plantas, pMON140502 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.Ssp1-1:1:2 (SEQ ID NO: 94), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164). El vector de transformación de plantas, pMON140503 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.CLUS120796-1 (SEQ ID NO: 12), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 39), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CLUS120796-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 120), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 173), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CLUS120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 119). El vector de transformación de plantas, pMON140504 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 37), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.CLUS1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 118). El vector de transformación de plantas, pMON140505 está compuesto por el grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-SETit.Ubq5 (SEQ ID NO: 22), que comprende además el elemento promotor, P-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-SETit.Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178). El vector de transformación de plantas, pMON140506 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.FM54-1:1:2 (SEQ ID NO: 52). El vector de transformación de la planta, pMON140507 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.FM63-1:1:2 (SEQ ID NO: 53). El vector de transformación de la

planta, pMON140508 está compuesto por el elemento promotor, P-SETit.CLUS 1165324-1:1:1 (SEQ ID NO: 38).

Los tejidos de las plantas de maíz se transforman utilizando procedimientos de bombardeo de partículas y semillas de maíz LH244 como se describe en el Ejemplo 3 anterior. La raíz y los tejidos foliares bombardeados se dejaron incubar en la oscuridad durante 24 horas a 26 ° C. Después de esta incubación durante la noche, los tejidos se tiñeron en solución para la expresión de GUS durante la noche a 37 grados centígrados. Después de la tinción durante la noche, los tejidos se empaparon en etanol al 70 % durante la noche para eliminar la clorofila y revelar la tinción de GUS. Los tejidos se fotografiaron a continuación y se asignó una escala de calificación de "0" a "4" que refleja el nivel de expresión de GUS en cada construcción.

La expresión del transgén de GUS demostrada en cada tejido se usó para inferir el nivel potencial relativo y la especificidad de la capacidad de cada elemento para impulsar la expresión del transgén en plantas de maíz transformadas de forma estable. En la Tabla 18 a continuación se proporcionan las clasificaciones de expresión de GUS promedio.

Tabla 18. Clasificaciones de expresión de GUS para el ensayo de bombardeo de partículas de promotores potenciales de semillas.

Construcción	Elementos reguladores	Embrión	Endospermo	Raíz	Hojas
pMON117992	P-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 50) L-SETit.EST CLUS675389-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 130)	1	1	1	0
pMON117993	P-SETit.Pro1-1:1:2 (SEQ ID NO: 77) L-SETit.Pro1-1:1:1 (SEQ ID NO: 151)	1	3	1	0
pMON117994	P-SETit.Pro2-1:1:3 (SEQ ID NO: 78) L-SETit.Pro2-1:1:2 (SEQ ID NO: 152)	1	3	1	0
pMON117995	P-SETit.CLUS882664-1 -1:1:2 (SEQ ID NO: 41) L-SETit.CLUS882664-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 123)	0	0	1	0
pMON117996	EXP-SETit.CLUS19108 (SEQ ID NO: 13) P-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 40) L-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 122) I-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 174) L-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 121)	3	3	2	0
pMON117997	P-SETit.Alc1 -1:1:1 (SEQ ID NO: 28) L-SETit.Alcl-1:1:1 (SEQ ID NO: 110)	1	4	1	0
pMON1 17998	P-SETit.Alc2-1:1:2 (SEQ ID NO: 30) L-SETit.Alc2-1:1:1 (SEQ ID NO: 111)	0	3	1	0
pMON1 17999	P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO:47) L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)	2	3	2	0
pMON130551	P-SETit.Alc1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29) L-SETit.Alcl-1:1:1 (SEQ ID NO: 110)	1	2	1	0
pMON140500	P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)	0	3	3	0
pMON140501	P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)	0	2	1	0
pMON140502	P-SETit.Ssp1-1:1:2 (SEQ ID NO: 94) L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)	0	3	1	0
pMON140503	EXP-SETit.CLUS 120796-1 (SEQ ID NO: 12) P-SETit.CLUS 120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 39) L-SETitCLUS120796-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 120) I-SETit.CLUS 120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 173) L-SETit.CLUS 120796-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 119)	1	0	2	0
pMON140504	P-SETit.CLUS 1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 37) L-SETit.CLUS 1164825-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 118)	0	0	1	0
pMON140505	EXP-SETit.Ubq5 (SEQ ID NO: 22) P-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104) L-SETit.Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170) I-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178)	4	5	4	4
pMON140506	P-SETit.FM54-1:1:2 (SEQ ID NO: 52)	1	0	1	0
pMON140507	P-SETit.FM63-1:1:2 (SEQ ID NO: 53)	1	0	2	0
pMON140508	P-SETit.CLUS1165324-1:1:1 (SEQ ID NO: 38)	0	0	1	0

En todos los casos, se observó cierta expresión de transgenes en tejidos bombardeados con la construcción que se muestra anteriormente en la Tabla 18. Los niveles más altos de expresión en la semilla se observaron para los tejidos bombardeados con las construcciones, pMON117996 ((EXP-SETit.CLUS19108 (SEQ ID NO: 13) compuesto por P-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 40) + L-SETit.CLUS19108-1:1:2 (SEQ ID NO: 122) + I-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 174) + L-SETit.CLUS19108-1:1:1 (SEQ ID NO: 121)) y pMON140505 ((EXP-SETit.Ubq5 (SEQ ID NO: 22) compuesto por P-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104) + L-SETit.Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170) + I-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178)). Sorprendentemente, la construcción pMON140505 ((EXP-SETit.Ubq5 (SEQ ID NO: 22) compuesta por P-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 104) + L-SETit.Ubq5-1:1:1 (SEQ ID NO: 170) + I-SETit.Ubq5-1:1:2 (SEQ ID NO: 178)) demostró altos niveles de expresión constitutiva que no habían sido previstos inicialmente por los recuentos de EST proporcionados en la Tabla 15 del ejemplo 7. Algunas construcciones tales como, pMON117998 (P-SETit.Alc2-1:1:2 (SEQ ID NO: 30) + L-SETit.Alc2-1:1:1 (SEQ ID NO: 111)); pMON140500 (P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) + L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)); pMON140501 (P-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 93) + L-SETit.Ssp1-1:1:1 (SEQ ID NO: 164) y pMON140502 (P-SETit.Sspl-1:1:2 (SEQ ID NO: 94) + L-SETit.Sspl-1:1:1 (SEQ ID NO: 164)), demostraron expresión en el endospermo y no en el embrión. Además, aunque la construcción, pMON140500 (P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48) + L-SETitDzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)) manifestó expresión solo en el endospermo, la construcción, pMON117999 (P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) + L-SETit.Dzs-1:1:1 (SEQ ID NO: 128)), que se compone de una versión más larga del promotor Dzs, (P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48)), demostró la expresión tanto en endospermo como en el embrión, sugiriendo el potencial para un potenciador de embriones que comprende el fragmento eliminado de P-SETit.Dzs-1:1:4 (SEQ ID NO: 47) para producir P-SETit.Dzs-1:1:5 (SEQ ID NO: 48).

Ejemplo 9: Elementos reguladores que impulsan la expresión de transgén de GUS en maíz o trigo transgénicos

Las plantas de maíz o trigo se transforman con construcciones que comprenden elementos reguladores, como los grupos de elementos reguladores de la transcripción, proporcionados como SEQ ID NOS: 1 a 22; o los promotores proporcionados como SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536, vinculados operativamente a cualquiera de los líderes proporcionados como SEQ ID NOS: 106 a 171 y 537 a 588. Los grupos o promotores de elementos reguladores de la transcripción pueden unirse operativamente a un transgén marcador, tal como GUS, similar al descrito en el ejemplo 2 anterior. Además, los elementos del intrón como los que se proporcionan como SEQ ID NOS: 172 a 267 y SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778 pueden unirse operativamente entre los elementos de expresión y el transgén de interés para mejorar la expresión o modular la expresión del transgén dentro de la planta transformada. Las plantas se transforman utilizando procedimientos de bombardeo de agrobacterium o partículas conocidos en la técnica. Los transformantes que contienen una o dos copias del casete del transgén se seleccionan usando procedimientos conocidos en la técnica. Los transformantes se ensayaron a continuación para determinar el nivel de expresión del transgén marcador en varios tejidos de la planta similares a los descritos en el ejemplo 2. La progenie F1 se produce al cruzar cualquier evento transformado con un evento no transformado, o por autofertilización. La progenie F1 crece y la expresión del transgén marcador se determina utilizando la progenie que posee una o dos copias del casete del transgén. Elementos reguladores quiméricos compuestos por cualquiera de los promotores, el líder y los intrones presentados anteriormente se seleccionan en función del nivel de expresión y la especificidad tisular de la expresión para impulsar transgenes de importancia agronómica o comercial.

Ejemplo 10: Potenciadores procedentes de los elementos reguladores

Los potenciadores se derivan de los elementos promotores presentados como SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536. El elemento potenciador puede estar compuesto por uno o más elementos reguladores en cis que, cuando están unidos de forma operativa en 5' o 3' a un elemento promotor, o están unidos de forma operativa en 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están operativamente unidos a un promotor, pueden potenciar o modular la expresión de un transgén, o proporcionar la expresión de un transgén en un tipo de célula u órgano vegetal específico o en un momento particular en el desarrollo o ritmo circadiano. Los potenciadores se preparan mediante la eliminación de la secuencia TATA o elementos funcionalmente similares y cualquier secuencia de ADN en la dirección 3' de los promotores que permiten que se inicie la transcripción de los promotores proporcionados presentados como las SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536 o fragmentos de las mismas, en los que se eliminan la secuencia TATA o elementos funcionalmente similares y la secuencia de ADN en la dirección 3' de la secuencia TATA.

Los elementos potenciadores se derivan de los elementos promotores presentados como SEQ ID NOS: 23 a 105 y las SEQ ID NOS: 353 a 536 y se clonaron utilizando procedimientos conocidos en la técnica para estar unidos operativamente en 5' o 3' a un elemento promotor, o unidos operativamente en 5' o 3' a elementos potenciadores adicionales que están unidos operativamente a un promotor. Como alternativa, los elementos potenciadores se clonaron usando procedimientos conocidos en la materia para estar unidos operativamente a una o más copias del elemento potenciador que están unidas operativamente en 5’ o 3’ a un elemento promotor, o unidas operativamente en 5’ o 3’ a elementos potenciadores adicionales que están unidos operativamente a un promotor. Los elementos potenciadores también se pueden clonar usando procedimientos conocidos en la técnica para unirse operativamente en 5’ o 3’ a un elemento promotor procedente de un organismo de género diferente, o unirse operativamente en 5’ o 3’ a elementos potenciadores adicionales procedentes de organismos de otro género u organismos del mismo

género que se unen operativamente a un promotor procedente del organismo del mismo o diferente género, dando como resultado un elemento regulador quimérico. Un vector de transformación de plantas de expresión de GUS se construye utilizando procedimientos conocidos en la materia similares a las construcciones descritos en los ejemplos previos en los que los vectores de expresión de plantas resultantes contienen una región del límite derecho de A. *tumefaciens,* un primer casete de expresión para probar el elemento regulador o un elemento regulador quimérico compuesto por, un elemento regulador o regulador quimérico, unido operativamente a un intrón derivado de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays o cualquiera de los intrones presentados como SEQ ID NOS: 172 a 267 y SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778 o cualquier otro intrón, unido operativamente a una secuencia codificante para la β-glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o ningún intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o a la región de terminación en 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por el promotor de Actina 1 del arroz) o alternativamente, el antibiótico kanamicina (impulsado por el promotor de la actina 1 del arroz) y una región del límite izquierdo de A. tumefaciens. Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar plantas de maíz u otro género de plantas mediante los procedimientos descritos anteriormente o mediante otros procedimientos de bombardeo de partículas o *mediados por Agrobacterium* conocidos en la materia. Como alternativa, las células de protoplastos procedentes de plantas de maíz u otro género se transforman utilizando procedimientos conocidos en la materia para realizar ensayos transitorios

La expresión de GUS impulsada por el elemento regulador que comprende uno o más potenciadores se evaluó en ensayos de plantas estables o transitorios para determinar los efectos del elemento potenciador sobre la expresión de un transgén. Las modificaciones a uno o más elementos potenciadores o la duplicación de uno o más elementos potenciadores se realizaron basándose en la experimentación empírica y la regulación de la expresión génica resultante que se observó utilizando cada composición de elementos reguladores. Alterar las posiciones relativas de uno o más potenciadores en el elemento regulador o regulador quimérico resultante puede alterar la actividad o especificidad transcripcional del elemento regulador o regulador quimérico y se determinó empíricamente para identificar los mejores potenciadores para el perfil de expresión del transgén deseado dentro de la planta de maíz u otro género de planta.

Ejemplo 11: Análisis de la potenciación mediada por intrón de la actividad GUS utilizando protoplastos procedentes de plantas

La introducción de un gen extraño en un hospedador vegetal nuevo no da como resultado siempre una alta expresión del gen entrante. Además, si se trata de rasgos complejos, algunas veces es necesario modular algunos genes con un patrón de expresión espacial o temporalmente diferente. Los intrones pueden proporcionar principalmente dicha modulación. Sin embargo, se ha mostrado que múltiples usos del mismo intrón en una planta presentan desventajas. En esos casos, es necesario tener una serie de elementos de control básicos para la construcción de elementos de ADN recombinante adecuados. Sin embargo, la recogida de intrones disponibles con propiedades que mejoran la expresión es limitada y se necesitan alternativas.

En plantas, la inclusión de algunos intrones en construcciones génicas conduce a un ARNm aumentado y a una acumulación de proteínas con respecto a las construcciones que carecen de intrón. Este efecto se ha denominado "potenciación mediada por intrones" (IME) de la expresión génica (Mascarenhas y col., (1990) Plant Mol. Biol. 15:913-920). Se han identificado intrones en genes de maíz que se sabe que estimulan la expresión en plantas (por ejemplo, tubA1, Adh1, Sh1, Ubi1 (Jeon y col. (2000) Plant Physiol. 123:1005-1014; Callis y col. (1987) Genes Dev. 1:1183-1200; Vasil y col. (1989) Plant Physiol. 91:1575-1579; Christiansen y col. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689) y en genes de arroz (por ejemplo, sal, *tpi:* McElroy y col., Plant Cell 2:163-171 (1990); Xu y col., Plant Physiol. 106:459-467 (1994)). De manera similar, se ha encontrado que intrones de genes de plantas dicotiledóneas como los de petunia (por ejemplo, *rbcS),* patata (por ejemplo, *st-ls1)* y de *Arabidopsis thaliana* (por ejemplo, *ubq3* y *pat1)* elevan las tasas de expresión de genes (Dean y col. (1989) Plant Cell 1: 201-208; Leon y col. (1991) Plant Physiol. 95:968-972; Norris y col. (1993) Plant Mol Biol 21:895-906; Rose y Last (1997) Plant J.11:455-464). Se ha mostrado que las deleciones o mutaciones en los sitios de corte y empalme de un intrón reducen la expresión génica, lo que indica que el corte y empalme podría ser necesario para IME (Mascarenhas y col. (1990) Plant Mol Biol. 15:913-920; Clancy y Hannah (2002) Plant Physiol. 130:918-929). Sin embargo, ese empalme que per se no se requiere para un determinado IME en plantas dicotiledóneas se ha demostrado mediante mutaciones puntuales dentro de los sitios de empalme del gen pat1 de *A. thaliana* (Rose y Beliakoff (2000) Plant Physiol. 122:535-542).

La potenciación de la expresión génica por los intrones no es un fenómeno general debido a que algunas inserciones de intrones en casetes de expresión recombinantes no consiguen potenciar la expresión (por ejemplo, intrones de genes de dicotiledóneas (el gen *rbcS* de guisante, el gen de la faseolina de habichuela y el gen *stls-1* de *Solanum tuberosum*) e intrones de genes de maíz *(* gen *adh1* el noveno intrón, el gen *hsp81* del primer intrón)) (Chee y col. (1986) Gene 41:47-57; Kuhlemeier y col. (1988) Mol Gen Genet 212:405-411; Mascarenhas y col. (1990) Plant Mol. Biol. 15:913-920; Sinibaldi y Mettler (1992) En WE Cohn, K Moldave, eds, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 42. Academic Press, Nueva York, págs. 229-257; Vancanneyt y col. 1990 Mol. Gen. Genet. 220:245-250). Por lo tanto, No se puede emplear cada intrón con el fin de manipular el nivel de expresión génica de genes no endógenos o genes endógenos en plantas transgénicas. ¿Qué características o

características específicas de la secuencia deben estar presentes en una secuencia de intrones para mejorar la tasa de expresión de un gen dado que no se conoce en la técnica anterior y, por lo tanto, de la técnica anterior no es posible prever si un intrón de una planta dada?, cuando se usa de forma heteróloga, causará IME.

Se seleccionó un intrón basándose en la experimentación y la comparación con un control de vector de expresión sin intrón para seleccionar empíricamente un intrón y una configuración dentro de la disposición de elementos de ADN-T para la expresión óptima de un transgén. Por ejemplo, en la expresión de un gen de resistencia a herbicida, como el CP4 que confiere resistencia al herbicida glifosato, es deseable tener una expresión del transgén dentro de los tejidos reproductivos así como los tejidos vegetativos, para evitar la pérdida de rendimiento cuando se aplica el herbicida. Un intrón en este caso se seleccionaría según su capacidad cuando esté unido operativamente a un promotor constitutivo, para potenciar la expresión del transgén que confiere resistencia a los herbicidas, particularmente dentro de las células y tejidos reproductivos de la planta transgénica y, por lo tanto, proporcionar tolerancia tanto vegetativa como reproductiva a la planta transgénica, cuando se pulveriza con el herbicida (ver, por ejemplo, Solicitud de Patente Internacional, WO2007/098042A2).

Los intrones presentados como SEQ ID NOS: 16 a 306 se identificaron utilizando cóntigos de ADN genómico en comparación con grupos de etiquetas de secuencia expresada o cóntigos de ADNc para identificar secuencias de exones e intrones dentro del ADN genómico. Además, Las secuencias 5’ UTR o secuencias líder también se utilizan para definir la unión de corte y empalme del intrón/exón de uno o más intrones en condiciones en las que la secuencia del gen codifica una secuencia líder que está interrumpida por uno o más intrones. Los intrones presentados como SEQ ID NOS: 172 a 267 y SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778 se clonaron usando procedimientos conocidos en la técnica en un vector de transformación de plantas para unirse operativamente en 3'a un elemento regulador de la transcripción y a un fragmento líder y unirse operativamente en 5' a un segundo fragmento líder o a secuencias de codificación como se representa en los dos casetes del transgén presentados en la Fig. 15. un primer casete de expresión posible (configuración 1 del casete de expresión en la figura 15) comprende un promotor o elemento promotor quimérico [A], unido operativamente en 5’ a un elemento líder [B], unido operativamente en 5’ a un elemento intrónico de prueba [C], unido operativamente a una región codificante [D], que está unida operativamente a un elemento 3’ UTR [E]. Como alternativa, un segundo casete de expresión posible (configuración 2 del casete de expresión en la figura 15) comprende un promotor o elemento promotor quimérico [F], unido operativamente en 5’ a un primer elemento líder o primer fragmento del elemento líder [G], unido operativamente en 5’ a un elemento intrónico de prueba [H], unido operativamente en 5’ a un segundo elemento líder o primer fragmento del segundo elemento líder [I], unido operativamente a una región codificante [J], que está unida operativamente a un elemento 3’ UTR [K].

Los primeros 6 nucleótidos en el extremo 5' y los últimos 6 nucleótidos en el extremo 3' de los intrones presentados como SEQ ID NOS: 172 a 267 y SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778 representan los nucleótidos antes y después de la unión de corte y empalme intrón/exón, respectivamente. Estas secuencias cortas de 6 nucleótidos se pueden alterar o modificar teniendo una secuencia adicional adjunta (es decir, nativa o artificial) para facilitar la clonación del intrón en un vector de transformación de la planta, siempre que el séptimo y octavo nucleótidos del extremo 5' (GT) y el séptimo y octavo nucleótido del extremo 3' (AG) de las SEQ ID NOS: 172 a 267 y SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778 se conserven, preservando así la unión de corte y empalme intrón/exón del intrón. Es preferible evitar el uso de la secuencia de nucleótidos TG o G justo antes de los nucleótidos séptimo y octavo del extremo 5' (GT) y la secuencia de nucleótidos, A o AT del séptimo y octavo nucleótido del extremo 3' (AG) para eliminar la posibilidad de que se formen codones de parada e inicio no deseados durante el procesamiento del ARN mensajero en la transcripción final.

Los intrones se ensayan para determinar la capacidad de potenciar la expresión en un ensayo transitorio o un ensayo de plantas estable. Para el ensayo transitorio de la potenciación mediada por intrón, se construyó un vector de planta básico utilizando procedimientos conocidos en la materia. El intrón se clonó en un vector de planta básico que comprende un casete de expresión compuesto por un promotor constitutivo tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5’ a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), enlazado operativamente en 5' a un elemento del intrón de prueba (SEQ ID NOS: 172 a 267 y SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778), unidas operativamente a una secuencia codificadora de la β-glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o ningún intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). Las células de protoplastos derivadas de maíz u otro género de tejido vegetal se transforman con el vector de planta básico y se analizan para determinar su actividad. Se realizó una comparación de la actividad utilizando un plásmido de control que comprendía el mismo casete del transgén que el plásmido de prueba, pero sin el intrón de prueba para ver si el intrón proporciona un efecto de mejora mediada por el intrón.

Dos plásmidos, para su uso en la transformación simultánea y normalización de datos, se construyeron también usando procedimientos conocidos en la materia. Cada plásmido contiene una secuencia de codificación específica de la luciferasa que está dirigida por un grupo constitutivo de elementos de expresión reguladores de la transcripción. El vector de planta, pMON19437 está compuesto por un casete de transgenes comprendido por un promotor constitutivo (EXP-CaMV.35S-enh, SEQ ID NO: 1095), unido operativamente en 5’ a un intrón, (I-Zm.DnaK-1:1:1, la SEQ ID NO: 1102), unida operativamente en 5’ a una secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga

(Photinus pyralis) (LUCIFERASA:1:3, la SEQ ID NO: 1109), unida operativamente en 5' a una región de terminación en 3' procedente del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, la SEQ ID NO: 1088). El vector de planta, pMON63934 está compuesto por un casete de transgenes comprendido por un grupo constitutivo de elementos de expresión reguladores de la transcripción, (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, la SEQ ID NO: 1106), unida operativamente en 5' a una secuencia codificante de luciferasa de pensamiento de mar *(Renilla reniformis)* (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, la SEQ ID NO: 1110), unida operativamente en 5' a una región de terminación en 3' procedente del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, la SEQ ID NO: 1088).

Los protoplastos de la hoja de maíz u otros protoplastos de plantas del género se transformaron utilizando un procedimiento de transformación basado en PEG, similar a los conocidos en la técnica. Las células de protoplastos se transformaron con una preparación de ADN que comprendía cantidades equimolares de los dos plásmidos de expresión de la luciferasa, pMON19437 y pMON63934 y uno de los plásmidos de ensayo y se incubaron durante la noche en la oscuridad total. Después de la incubación, las células se enjuagaron, se resuspendieron y se lisaron. Las mediciones de GUS y luciferasa se realizaron utilizando alícuotas de cada preparación de lisis. Esencialmente, las células de protoplastos transformados recogidas se lisaron en un tampón de lisis pasivo 5X (Promega). Después de permitir la lisis, las alícuotas de la preparación lisada se colocaron en dos bandejas diferentes de pocillos pequeños. Una bandeja se utilizó para las mediciones de GUS. Para el análisis cuantitativo de la expresión de GUS, la proteína total se extrajo de la preparación de lisis. Se usó un microgramo de proteína total con el sustrato fluorógeno 4-metileumbeliferil-β-D-glucurónido (MUG) en un volumen de reacción total de 50 microlitros. El producto de reacción, 4-metilumbeliferona (4-MU), tiene fluorescencia máxima a pH elevado, cuando el grupo hidroxilo está ionizado. La adición de una solución básica de carbonato de sodio detiene simultáneamente el ensayo y ajusta el pH para cuantificar el producto fluorescente. La fluorescencia se midió con excitación a 365 nm, emisión a 445 nm utilizando un Fluoromax-3 con Micromax Reader, con una anchura de rendija configurada para una excitación de 2 nm y una emisión de 3 nm. Los valores de GUS se expresan como pmol de proteína 4-MU por minuto por miligramo de proteína (pmol 4-MU min $^{-1}$ mg $^{-1}$ de proteína).

La segunda bandeja se usó para realizar un ensayo de luciferasa dual como se describe en el Ejemplo 5 anterior. Para comparar la capacidad relativa del intrón de potenciar la expresión, los valores de GUS se expresaron como una relación de actividad de GUS a luciferasa y se compararon con los niveles impartidos por el promotor constitutivo y un patrón de intrón conocido, como el intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays,* I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102).

Para el ensayo de plantas estable de los intrones presentados como SEQ ID NOS: 172 a 267 y SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778, Un vector de transformación de plantas de expresión de GUS se construye utilizando procedimientos conocidos en la materia similares a las construcciones descritos en los ejemplos previos en los que los vectores de expresión de plantas resultantes contienen una región del borde derecho de A. *tumefaciens,* un primer casete del transgén para probar el intrón comprendido por un promotor constitutivo como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), enlazado operativamente en 5' a un elemento del intrón de prueba (SEQ ID NOS: 16 a 306), unidas operativamente a una secuencia de codificación de β-glucuronidasa (GUS) que posee un intrón procesable (GUS-2, la SEQ ID NO: 1091) o ningún intrón (GUS-1, la SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, la SEQ ID NO: 1088); un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por el promotor de la Actina 1 del arroz) o alternativamente, el antibiótico kanamicina (impulsado por el promotor de la actina 1 del arroz) y una región del límite izquierdo de A. *tumefaciens*. Los plásmidos resultantes se utilizan para transformar plantas de maíz u otro género de plantas mediante los procedimientos descritos anteriormente o mediante procedimientos *mediados por Agrobacterium* conocidos en la materia. Los transformantes de copia única o bajo número de copias se seleccionan para comparación con plantas transformadas de copia única o bajo número de copias, transformadas con un vector de transformación de plantas idéntico al vector de prueba pero sin el intrón de prueba para determinar si el intrón de prueba proporciona un efecto potenciado mediado por intrones.

Cualquiera de los intrones presentados como SEQ ID NOS: 172 a 267 y SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778 se puede modificar de varias maneras, como eliminando fragmentos dentro de la secuencia de intrones que pueden reducir la expresión o la duplicación de fragmentos con el intrón que puede potenciar la expresión. Además, las secuencias dentro del intrón que pueden afectar la especificidad de la expresión tanto a tipos de células o tejidos y órganos particulares pueden duplicarse o alterarse o eliminarse para alterar la expresión y los patrones de expresión del transgén. Además, los intrones presentados como SEQ ID NOS: 172 a 267 y SEQ ID NOS: 317 a 323 y las SEQ ID NOS: 589 a 778 pueden modificarse para eliminar cualquier posible codón de inicio (ATG) que pueda ocasionar que las transcritos no intencionados que se expresan desde intrones cortados y empalmados incorrectamente como proteínas diferentes, más largas o truncadas. Una vez que el intrón ha sido probado empíricamente, o ha sido alterado basándose en la experimentación, el intrón se utiliza para potenciar la expresión de un transgén en plantas transformadas de manera estable que pueden ser de cualquier género de planta, monocotiledónea o dicotiledónea, siempre que el intrón proporcione una potenciación del transgén. El intrón también se puede utilizar para potenciar la expresión en otros organismos, como algas, hongos o células animales, siempre que el intrón proporcione una potenciación o atenuación o especificidad de la expresión del transgén al que está

unido operativamente.

Ejemplo 12: Construcciones de plásmidos compuestas de casetes transgénicos para el análisis de la potenciación mediada por intrones de la actividad del transgén GUS

Los elementos del intrón aislados de *Setaria italica* se clonaron utilizando procedimientos conocidos en la técnica en construcciones de plásmidos que comprenden un promotor constitutivo para probar el efecto del intrón sobre la expresión de un transgén GUS impulsado por un promotor constitutivo.

Los elementos del intrón presentados como SEQ ID NOS: 179 a 267 se clonaron en construcciones de plásmidos que comprendían un promotor constitutivo, P-CaMV.35S-enh-1:1:13 (SEQ ID NO: 1112), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), unido operativamente a un elemento del intrón de prueba (SEQ ID NOS: 179 a 267), unido operativamente en 5' a una secuencia de codificación de GUS, (GUS-1, la SEQ ID NO: 1090), unida operativamente en 5' a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, la SEQ ID NO: 1088). El identificador de construcción del plásmido junto con cada anotación de intrón se presenta en la Tabla 19 a continuación.

Tabla 19. Construcciones de plásmidos que comprenden casetes del transgén para evaluar la potenciación mediada por intrones de la expresión del transgén de GUS.

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:
pMON138824	I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1	179
pMON138826	I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2	180
pMON138816	I-SETit.14-3-3A-4-1:1:2	181
pMON138813	I-SETit.14-3-3A-5-1:1:2	182
pMON138829	I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1	183
pMON138830	I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2	184
pMON138820	I-SETit.14-3-3B-4-1:1:2	185
pMON138821	I-SETit.14-3-3B-5-1:1:2	186
pMON138831	I-SETit.14-3-3C-1-1:1:1	187
pMON138823	I-SETit.14-3-3C-2-1:1:1	188
pMON138817	I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2	189
pMON138832	I-SETit.14-3-3C-4-1:1:2	190
pMON138822	I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2	191
pMON138825	I-SETit.14-3-3D-1-1:1:2	192
pMON138828	I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1	193
pMON138814	I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2	194
pMON138827	I-SETit.14-3-3D-4-1:1:3	195
pMON138843	I-SETit.14-3-3D-5-1:1:2	196
pMON138835	I-SETit.14-3-3E-2-1:1:1	197
pMON138836	I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2	198
pMON138845	I-SETit.14-3-3E-4-1:1:2	199
pMON138841	I-SETit.14-3-3E-5-1:1:2	200
pMON138794	I-SETit.40S-7S-1_1-1:1:2	201
pMON138792	I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:2	202
pMON138791	I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2	203
pMON138788	I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:2	204
pMON138798	I-SETit.40S-7S-2_2-1:1:1	205
pMON138802	I-SETit.40S-7S-2_3-1:1:1	206
pMON138807	I-SETit.40S-7S-2_4-1:1:1	207
pMON138809	I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:2	208
pMON138810	I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:2	209
pMON138800	I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:2	210
pMON138837	I-SETit.60S_L10A1-1-1:1:2	211
pMON138847	I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2	212

(continuación)

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:
pMON138840	I-SETit.60S_L10A1-3-1:1:2	213
pMON140752	I-SETit.60S_L10A1-4-1:1:1	214
pMON140750	I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2	215
pMON140758	I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216
pMON140757	I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217
pMON138783	I-SETit.DnaJ_1-1:1:2	218
pMON138848	I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219
pMON138786	I-SETit.eEF1 g_1-1:1:2	220
pMON138787	I-SETit.eEF1g_ 4-1:1:3	221
pMON138842	I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1	222
pMON138833	I-SETit.eIF5A1-2-1:1:2	223
pMON138844	I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224
pMON138834	I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225
pMON140751	I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226
pMON138838	I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227
pMON138839	I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228
pMON138846	I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229
pMON138849	I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230
pMON140756	I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231
pMON140753	I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232
pMON140769	I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233
pMON140754	I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234
pMON140760	I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235
pMON140763	I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236
pMON138808	I-SETit.GAD_1-1:1:2	237
pMON138819	I-SETit.GAD_2-1:1:2	238
pMON138815	I-SETit.GAD_3-1:1:2	239
pMON138818	I-SETit.GAD_4-1:1:2	240
pMON140765	I-SETit.Grf 1-3-1:1:1	241
pMON138806	I-SETit.GRP-1-1:1:1	242
pMON140768	I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243
pMON140767	I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244
pMON140771	I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245
pMON140762	I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246
pMON138812	I-SETit.PGK3_1-1:1:2	247
pMON138804	I-SETit.PGK3_2-1:1:1	248
pMON138793	I-SETit.PIP1_1_2-1:1:1	249
pMON138797	I-SETit.PIPI-1-1_1:1:1	250
pMON138796	I-SETit.PIP1-1_3-1:1:2	251
pMON138785	I-SETit.PIP1-4_3-1:1:2	252
pMON138784	I-SETit.PIP2-2_2-1:1:2	253
pMON138789	I-SETit.PIP2-2_3-1:1:2	254
pMON138790	I-SETit.PIP2-5_2-1:1:2	255
pMON138795	I-SETit.PIP2-5_3-1:1:2	256
pMON140764	I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257
pMON140766	I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258
pMON140770	I-SETit.SBD-1-1:1:2	259

(continuación)

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:
pMON140761	I-SETit.SBD-2-1:1:1	260
pMON140759	I-SETit.SBD-3-1:1:2	261
pMON138799	I-SETitTubA2_1-1:1:1	262
pMON138801	I-SETit.TubA2_2-1:1:1	263
pMON138805	I-SETit.TubA2_3-1:1:1	264
pMON138811	I-SETit.T ubA3_1-1:1:1	265
pMON138803	I-SETit.TubA3_2-1:1:1	266
pMON140755	I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267

Cada plásmido se usó como molde para la amplificación mediante la PCR del casete del transgén para su uso en el ensayo de protoplastos como se describe a continuación.

Ejemplo 13: Análisis de la potenciación mediada por intrones de la actividad de GUS utilizando protoplastos de maíz

Células de protoplasto, derivado del tejido de la hoja de maíz, se transformaron con casetes del transgén en forma de amplicones de la PCR para determinar el efecto de cada intrón en la expresión del transgén, GUS, impulsado por un promotor constitutivo y comparado con los intrones que se sabe que tienen un efecto de potenciación en la expresión transgénica.

Las construcciones descritas en el ejemplo 12 anterior y presentadas en la Tabla 19 del ejemplo 12 se usaron como molde para generar amplicones de la PCR utilizando procedimientos conocidos en la técnica que comprenden un promotor constitutivo, P-CaMV.35S-enh-1:1:13 (SEQ ID NO: 1112), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), unido operativamente a un elemento del intrón de prueba (SEQ ID NOS: 179 a 267), unido operativamente en 5' a una secuencia de codificación de GUS, (GUS-1, la SEQ ID NO: 1090), unida operativamente en 5' a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, la SEQ ID NO: 1088). Además, Se generaron también amplicones derivados de plásmidos de control utilizando los mismos procedimientos de amplificación de las construcciones de plásmidos de control, pMON19469, pMON65328, pMON25455, pMON8677 y pMON33449. El casete de transgenes de pMON19469 se compone del grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh/I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1104) y proporciona una comparación del promotor constitutivo potenciado utilizando el intrón I-Zm.DnaK-1:1:1. El casete de transgenes de pMON65328 se compone del grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1 / I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105) y proporciona una comparación de la potenciación del promotor constitutivo utilizando el intrón, I-Os.Act1-1:1:9. El casete de transgenes de pMON25455 se compone del grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098) y proporciona una comparación de la expresión utilizando el promotor nativo, el elemento líder y el intrón del gen de la actina 1 del arroz. El casete de transgenes de pMON8677 está compuesto por el promotor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096) está unido operativamente a la secuencia de codificación de GUS y proporciona una comparación de la expresión con un promotor constitutivo sin un intrón para la potenciación. El casete del transgén de pMON33449 está compuesto por una variante del promotor CaMV 35S (P-E35S:1:52, la SEQ ID NO: 1117) y proporciona un comparador adicional que carece de un intrón.

Células de protoplasto, derivadas del tejido de la hoja de maíz se transformaron utilizando procedimientos de transformación basados en PEG conocidos en la técnica. En resumen, cada construcción de prueba y control se usó para proporcionar un molde para la amplificación del casete del transgén que comprende cada construcción. El amplicón resultante se fraccionó por tamaño en un gel de agarosa y el ADN del amplicón se escindió del gel. El ADN del amplicón se extrajo del fragmento de gel utilizando procedimientos conocidos en la técnica y cuantificados mediante espectrofotometría. Las células de protoplastos se transformaron utilizando procedimientos de PEG conocidos en la técnica y utilizando tanto 0,3 como 0,1 picomoles de ADN del amplicón de la PCR. Se realizaron de dos a cuatro repeticiones para cada transformación y se determinó la expresión promedio impartida por cada construcción. La expresión de GUS media observada para cada amplicón derivado de la construcción se normalizó con respecto a la expresión observada para el amplicón derivado de pMON19469 que comprende el elemento del intrón, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102). Las tablas 20 y 21 a continuación muestran la expresión de GUS promedio normalizada impartida derivada de los amplicones de las construcciones presentadas en la tabla 19 del ejemplo 12 en relación con la expresión de GUS promedio impartida a amplicones derivados de los plásmidos de control descritos anteriormente utilizando 0.3 y 0.1 pmol de amplicón, respectivamente.

Tabla 20. Potenciación mediada por intrones de la expresión de GUS en protoplastos de maíz en relación con I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) utilizando 0,3 pmol de ADN del amplicón.

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación estándar
pMON138842	I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1	222	3,19777	0,14472
pMON140750	I-SETit.60S_ L10A1-5-1:1:2	215	2,73551	0,14472
pMON138806	I-SETit.GRP-1-1:1:1	242	2,24406	0,16711
pMON140768	I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243	1,79949	0,14472
pMON138847	I-SETit.60S_ L10A1-2-1:1:2	212	1,76055	0,14472
pMON138805	I-SETit.TubA2_3-1:1:1	264	1,6441	0,16711
pMON138826	I-SETit.14-3-3A-3-1:1: 2	180	1,59333	0,14472
pMON138844	I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224	1,51864	0,16711
pMON138845	I-SETit.14-3-3E-4-1:1: 2	199	1,47841	0,14472
pMON138785	I-SETitPIP1-4_3-1:1:2	252	1,45536	0,14472
pMON138812	I-SETit.PGK3_1-1:1:2	247	1,36129	0,14472
pMON138809	I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:2	208	1,35665	0,14472
pMON138796	I-SETit.PIP1-1_3-1:1:2	251	1,30268	0,14472
pMON140762	I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246	1,28583	0,14472
pMON138839	I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228	1,26341	0,16711
pMON138836	I-SETit.14-3-3E-3-1:1: 2	198	1,23008	0,14472
pMON140767	I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244	1,22373	0,14472
pMON138824	I-SETit.14-3-3A-2-1:1: 1	179	1,2226	0,16711
pMON140754	I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234	1,22009	0,14472
pMON138829	I-SETit.14-3-3B-2-1:1: 1	183	1,17955	0,14472
pMON138827	I-SETit.14-3-3D-4-1:1: 3	195	1,15355	0,14472
pMON138831	I-SETit.14-3-3C-1-1:1: 1	187	1,13972	0,20467
pMON138817	I-SETit.14-3-3C-3-1:1: 2	189	1,09812	0,14472
pMON138783	I-SETit.DnaJ_1-1:1:2	218	1,08489	0,14472
pMON140769	I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233	1,0434	0,14472
pMON138792	I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:2	202	1,04308	0,16711
pMON140760	I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235	1,04187	0,14472
pMON140758	I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216	1,01034	0,14472
pMON19469	I-Zm.DnaK-1:1:1	1102	1	0,14472
pMON140761	I-SETit.SBD-2-1:1:1	260	0,99105	0,16711
pMON138794	I-SETit.40S-7S-1_1-1:1:2	201	0,98962	0,14472
pMON138789	I-SETit.PIP2-2_ 3-1:1: 2	254	0,96195	0,14472
pMON138791	I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2	203	0,94544	0,14472
pMON138830	I-SETit.14-3-3B-3-1:1: 2	184	0,92124	0,16711
pMON140766	I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258	0,88915	0,14472
pMON138803	I-SETit.TubA3_2-1:1:1	266	0,83768	0,16711
pMON138832	I-SETit.14-3-3C-4-1:1: 2	190	0,80355	0,14472
pMON138848	I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219	0,7898	0,16711
pMON138835	I-SETit.14-3-3E-2-1:1: 1	197	0,78927	0,14472
pMON138834	I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225	0,77272	0,14472
pMON138821	I-SETit.14-3-3B-5-1:1: 2	186	0,671	0,14472
pMON138849	I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230	0,67063	0,14472
pMON138786	I-SETit.eEF1 g_1-1:1:2	220	0,6574	0,16711
pMON140756	I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231	0,6269	0,16711
pMON65328	I-Os.Act1-1:1:19	1113	0,58395	0,14472
pMON138840	I-SETit.60S_ L10A1-3-1:1:2	213	0,57366	0,14472

(continuación)

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación estándar
pMON138822	I-SETit.14-3-3C-5-1:1: 2	191	0,55845	0,14472
pMON140757	I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217	0,53607	0,14472
pMON140753	I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232	0,52545	0,14472
pMON138820	I-SETit.14-3-3B-4-1:1: 2	185	0,52034	0,16711
pMON138800	I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:2	210	0,51862	0,16711
pMON138828	I-SETit.14-3-3D-2-1:1: 1	193	0,51592	0,14472
pMON138813	I-SETit.14-3-3A-5-1:1: 2	182	0,51379	0,14472
pMON138843	I-SETit.14-3-3D-5-1:1: 2	196	0,50543	0,14472
pMON138825	I-SETit.14-3-3D-1-1:1: 2	192	0,48895	0,14472
pMON138814	I-SETit.14-3-3D-3-1:1: 2	194	0,48519	0,14472
pMON138818	I-SETit.GAD_4-1:1:2	240	0,47986	0,14472
pMON138811	I-SETit.T ubA3_1-1:1: 1	265	0,47762	0,16711
pMON138823	I-SETit.14-3-3C-2-1:1: 1	188	0,41543	0,14472
pMON138837	I-SETit.60S_ L10A1-1-1: 1:2	211	0,40991	0,14472
pMON138846	I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229	0,40485	0,14472
pMON140763	I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236	0,40131	0,14472
pMON138838	I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227	0,37694	0,14472
pMON138801	I-SETit.TubA2_2-1:1:1	263	0,35386	0,14472
pMON138804	I-SETit.PGK3_2-1:1:1	248	0,35284	0,16711
pMON140765	I-SETit.Grf1-3-1:1:1	241	0,32325	0,16711
pMON140755	I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267	0,31895	0,16711
pMON138790	I-SETit.PIP2-5_2-1:1:2	255	0,2957	0,16711
pMON140770	I-SETit.SBD-1-1:1:2	259	0,29309	0,14472
pMON138784	I-SETit.PIP2-2_ 2-1:1: 2	253	0,29174	0,14472
pMON138808	I-SETit.GAD_1-1:1:2	237	0,2874	0,14472
pMON138807	I-SETit.40S-7S-2_4-1:1:1	207	0,27522	0,16711
pMON138819	I-SETit.GAD_2-1:1:2	238	0,27038	0,14472
pMON138833	I-SETiteIF5A1-2-1:1:2	223	0,25147	0,14472
pMON138795	I-SETit.PIP2-5_3-1:1:2	256	0,24221	0,14472
pMON138802	I-SETit.40S-7S-2_3-1:1:1	206	0,23983	0,16711
pMON25455 EXP-Os.Act1 (SEQ ID NO: 1098)	EXP-Os.Act1		0,21736	0,16711
pMON140759	I-SETit.SBD-3-1:1:2	261	0,2172	0,16711
pMON138787	I-SETit.eEF1 g_4-1:1:3	221	0,17568	0,14472
pMON138810	I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:2	209	0,16997	0,14472
pMON138816	I-SETit.14-3-3A-4-1:1: 2	181	0,16765	0,14472
pMON138815	I-SETit.GAD_3-1:1:2	239	0,16017	0,20467
pMON138788	I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:2	204	0,15842	0,16711
pMON140752	I-SETit.60S_ L10A1-4-1:1:1	214	0,15302	0,14472
pMON140751	I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226	0,14712	0,14472
pMON138841	I-SETit.14-3-3E-5-1:1: 2	200	0,14157	0,14472
pMON8677	Sin intrón		0,14109	0,14472
pMON138798	I-SETit.40S-7S-2_2-1:1:1	205	0,11752	0,16711
pMON138793	I-SETit.PIP1_1_2-1:1:1	249	0,11305	0,14472
pMON33449	Sin intrón		0,10504	0,14472
pMON140764	I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257	0,10398	0,16711

(continuación)

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación estándar
pMON140771	I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245	0,09975	0,14472
pMON138797	I-SETit.PIP 1-1_1-1:1: 1	250	0,03152	0,14472
pMON138799	I-SETitTubA2_1-1:1:1	262	0,01853	0,14472
Sin ADN			0,001	0,20467

Usando 0,3 pmol del amplicón, la mayoría de los elementos intrón de prueba, derivados de *S. italica,* potenciaron la expresión de GUS en relación con los controles sin intrón que utilizan un promotor similar (pMON8677 y pMON33449). Se observó una potenciación mejorada de la expresión de GUS, en relación con el elemento del intrón, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) para los elementos del intrón, I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 222), I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 215), I-SETit.GRP-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 242), I-SETit.LSm8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 243), I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 212), I-SETit.TubA2_3-1:1:1 (SEQ ID NO: 264), I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 180), I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 224), I-SETit.14-3-3E-4-1: 1:2 (SEQ ID NO: 199), I-SETitPIP1-4_3-1:1:2 (SEQ ID NO: 252), I-SETitPGK3_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 247), I-SETit40S-7S-3_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 208), I-SETit.PIP1-1 _3-1:1:2 (SEQ ID NO: 251), I-SETit.LSm8-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 246), I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3 (SEQ ID NO: 228), I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 198), I-SETit.LSm8-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 244), I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 179), I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 234), I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 183), I-SETit.14-3-3D-4-1:1:3 (SEQ ID NO: 195), I-SETit.14-3-3C-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 187), I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 189), I-SETitDnaJ_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 218), I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 233), I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:2 (SEQ ID NO: 202), I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 235) y I-SETit.ASA2-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 216). Los datos se muestran en la Tabla 21 a continuación.

Tabla 21. Potenciación mediada por intrones de la expresión de GUS en protoplastos de maíz en relación con I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) utilizando 0,1 pmol de ADN del amplicón.

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación estándar
pMON138842	I-SETit.eIF5A1-1-1:1:1	222	3,19777	0,14472
pMON140750	I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2	215	2,73551	0,14472
pMON1 38806	I-SETit.G RP-1-1:1:1	242	2,24406	0,16711
pMON140768	I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243	1,79949	0,14472
pMON138847	I-SETit.60S_ L10A1-2-1:1:2	212	1,76055	0,14472
pMON138805	I-SETit.TubA2_3-1:1:1	264	1,6441	0,16711
pMON138826	I-SETit.14-3-3A-3-1: 1:2	180	1,59333	0,14472
pMON138844	I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224	1,51864	0,16711
pMON138845	I-SETit.14-3-3E-4-1: 1:2	199	1,47841	0,14472
pMON138785	I-SETit.PIP1-4_3-1:1:2	252	1,45536	0,14472
pMON138812	I-SETit.PGK3_1-1:1:2	247	1,36129	0,14472
pMON138809	I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:2	208	1,35665	0,14472
pMON138796	I-SETit.PIP1-1_3-1:1:2	251	1,30268	0,14472
pMON140762	I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246	1,28583	0,14472
pMON138839	I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228	1,26341	0,16711
pMON138836	I-SETit.14-3-3E-3-1: 1:2	198	1,23008	0,14472
pMON140767	I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244	1,22373	0,14472
pMON138824	I-SETit.14-3-3A-2-1:1:1	179	1,2226	0,16711
pMON140754	I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234	1,22009	0,14472
pMON138829	I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1	183	1,17955	0,14472
pMON138827	I-SETit.14-3-3D-4-1: 1:3	195	1,15355	0,14472
pMON138831	I-SETit.14-3-3C-1-1:1:1	187	1,13972	0,20467
pMON138817	I-SETit.14-3-3C-3-1: 1:2	189	1,09812	0,14472
pMON138783	I-SETit.DnaJ_1-1:1:2	218	1,08489	0,14472
pMON140769	I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233	1,0434	0,14472

(continuación)

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación estándar
pMON138792	I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:2	202	1,04308	0,16711
pMON140760	I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235	1,04187	0,14472
pMON140758	I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216	1,01034	0,14472
pMON19469	I-Zm.DnaK-1:1:1	1102	1	0,14472
pMON140761	I-SETit.SBD-2-1:1:1	260	0,99105	0,16711
pMON138794	I-SETit.40S-7S-1_1-1:1:2	201	0,98962	0,14472
pMON138789	I-SETit.PIP2-2_ 3-1:1: 2	254	0,96195	0,14472
pMON138791	I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2	203	0,94544	0,14472
pMON138830	I-SETit.14-3-3B-3-1: 1:2	184	0,92124	0,16711
pMON140766	I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258	0,88915	0,14472
pMON138803	I-SETit.TubA3_2-1:1:1	266	0,83768	0,16711
pMON138832	I-SETit.14-3-3C-4-1: 1:2	190	0,80355	0,14472
pMON138848	I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219	0,7898	0,16711
pMON138835	I-SETit.14-3-3E-2-1:1:1	197	0,78927	0,14472
pMON138834	I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225	0,77272	0,14472
pMON138821	I-SETit.14-3-3B-5-1: 1:2	186	0,671	0,14472
pMON138849	I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230	0,67063	0,14472
pMON138786	I-SETit.eEF1 g_1-1:1:2	220	0,6574	0,16711
pMON140756	I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231	0,6269	0,16711
pMON65328	I-Os.Act1-1:1:19	1113	0,58395	0,14472
pMON138840	I-SETit.60S_ L10A1-3-1: 1:2	213	0,57366	0,14472
pMON138822	I-SETit.14-3-3C-5-1: 1:2	191	0,55845	0,14472
pMON140757	I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217	0,53607	0,14472
pMON140753	I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232	0,52545	0,14472
pMON138820	I-SETit.14-3-3B-4-1: 1:2	185	0,52034	0,16711
pMON138800	I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:2	210	0,51862	0,16711
pMON138828	I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1	193	0,51592	0,14472
pMON138813	I-SETit.14-3-3A-5-1: 1:2	182	0,51379	0,14472
pMON138843	I-SETit.14-3-3D-5-1: 1:2	196	0,50543	0,14472
pMON138825	I-SETit.14-3-3D-1-1: 1:2	192	0,48895	0,14472
pMON138814	I-SETit.14-3-3D-3-1: 1:2	194	0,48519	0,14472
pMON138818	I-SETit.GAD_4-1:1:2	240	0,47986	0,14472
pMON138811	I-SETit.TubA3_1-1:1: 1	265	0,47762	0,16711
pMON138823	I-SETit.14-3-3C-2-1:1:1	188	0,41543	0,14472
pMON138837	I-SETit.60S_L10A1-1-1: 1:2	211	0,40991	0,14472
pMON138846	I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229	0,40485	0,14472
pMON140763	I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236	0,40131	0,14472
pMON138838	I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227	0,37694	0,14472
pMON138801	I-SETit.TubA2_2-1:1:1	263	0,35386	0,14472
pMON138804	I-SETit.PGK3_2-1:1:1	248	0,35284	0,16711
pMON140765	I-SETit.Grf1-3-1:1:1	241	0,32325	0,16711
pMON140755	I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267	0,31895	0,16711
pMON138790	I-SETit.PIP2-5_2-1:1:2	255	0,2957	0,16711
pMON140770	I-SETit.SBD-1-1:1:2	259	0,29309	0,14472
pMON138784	I-SETit.PIP2-2_2-1:1:2	253	0,29174	0,14472
pMON138808	I-SETit.GAD_1-1:1:2	237	0,2874	0,14472

(continuación)

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación estándar
pMON138807	I-SETit.40S-7S-2_4-1:1:1	207	0,27522	0,16711
pMON138819	I-SETit.GAD_2-1:1:2	238	0,27038	0,14472
pMON138833	I-SETit.eIF5A1-2-1:1:2	223	0,25147	0,14472
pMON138795	I-SETit.PIP2-5_3-1:1:2	256	0,24221	0,14472
pMON138802	I-SETit.40S-7S-2_3-1:1:1	206	0,23983	0,16711
pMON25455 EXP-Os.Act1 (SEQ ID NO: 1098)	EXP-Os.Act1		0,21736	0,16711
pMON140759	I-SETit.SBD-3-1:1:2	261	0,2172	0,16711
pMON138787	I-SETit.eEF1 g_4-1:1:3	221	0,17568	0,14472
pMON138810	I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:2	209	0,16997	0,14472
pMON138816	I-SETit.14-3-3A-4-1: 1:2	181	0,16765	0,14472
pMON138815	I-SETit.GAD_3-1:1:2	239	0,16017	0,20467
pMON138788	I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:2	204	0,15842	0,16711
pMON140752	I-SETit.60S_ L10A1-4-1:1:1	214	0,15302	0,14472
pMON140751	I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226	0,14712	0,14472
pMON138841	I-SETit.14-3-3E-5-1: 1:2	200	0,14157	0,14472
pMON8677	Sin intrón		0,14109	0,14472
pMON138798	I-SETit.40S-7S-2_2-1:1:1	205	0,11752	0,16711
pMON138793	I-SETit.PIP1_1_2-1:1:1	249	0,11305	0,14472
pMON33449	Sin intrón		0,10504	0,14472
pMON140764	I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257	0,10398	0,16711
pMON140771	I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245	0,09975	0,14472
pMON138797	I-SETit.PIP 1-1_1-1:1: 1	250	0,03152	0,14472
pMON138799	I-SETitTubA2_1-1:1:1	262	0,01853	0,14472
Sin ADN			0,001	0,20467

La tendencia básica en la potenciación fue similar utilizando 0,1 pmol del amplicón. La mayoría de los elementos intrón de prueba, derivados de *S. italica*, potenciaron la expresión de GUS en relación con los controles sin intrón que utilizan un promotor similar (pMON8677 y pMON33449). Se observó una potenciación mejorada de la expresión de GUS, en relación con el elemento del intrón, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) utilizando los elementos del intrón, I-SETit.LSm8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 243), I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 215), I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 224), I-SETit.GRP-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 242), I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 193), I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 194), I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 234), I-SETit.LSm8-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 246), I-SETit.LSm8-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 244), I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 233), I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 225), I-SETit.ASA2-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 216), I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 212), I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 231), I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 184), I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 183), I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 219), I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 180), I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 235), I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 191), I-SETit.TubA3_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 266), I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2 (SEQ ID NO: 203), I-SETit.TubA2_3-1:1:1 (SEQ ID NO: 264), I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 189), I-SETit.Prx3-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 258) and I-SETitDnaJ_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 218).

Ejemplo 14: Análisis de la potenciación mediada por intrones de la actividad de GUS usando protoplastos de trigo

Células de protoplasto, derivadas del tejido de la hoja de trigo, se transformaron con casetes del transgén en forma de amplicones de la PCR para determinar el efecto de cada intrón en la expresión del transgén, GUS, impulsado por un promotor constitutivo y comparado con los intrones que se sabe que tienen un efecto de potenciación en la expresión transgénica.

Las construcciones descritas en el ejemplo 12 anterior y presentadas en la Tabla 19 del ejemplo 12 se usaron como molde para generar amplicones de la PCR utilizando procedimientos conocidos en la técnica que comprenden un promotor constitutivo, P-CaMV.35S-enh-1:1:13 (SEQ ID NO: 1112), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-CaMV.35S-1:1:15 (SEQ ID NO: 1111), unido operativamente a un elemento del intrón de prueba (SEQ ID NOS: 179 a 267), unido operativamente en 5' a una secuencia de codificación de GUS, (GUS-1, la SEQ ID NO: 1090), unida operativamente en 5' a la región de terminación en 3' de la nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-

1:1:13, la SEQ ID NO: 1088). Además, Los amplicones, derivados de plásmidos de control también se generaron utilizando los mismos procedimientos de amplificación de las construcciones de plásmidos de control, pMON19469, pMON65328, pMON25455, pMON8677 y pMON33449. El casete de transgenes de pMON19469 se compone del grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh/I-ZmDnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1104) y proporciona una comparación del promotor constitutivo potenciado utilizando el intrón I-Zm.DnaK-1:1:1. El casete de transgenes de pMON65328 se compone del grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1 / I-Os.Act1-1:1:9 (SEQ ID NO: 1105) y proporciona una comparación de la potenciación del promotor constitutivo utilizando el intrón, I-Os.Actl-1:1:9. El casete de transgenes de pMON25455 se compone del grupo de elementos reguladores de la transcripción, EXP-Os.Act1:1:1 (SEQ ID NO: 1098) y proporciona una comparación de expresión utilizando el promotor nativo, el elemento líder y el intrón del gen de la actina 1 del arroz. El casete de transgenes de pMON8677 está compuesto por el promotor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096) unido operativamente a la secuencia de codificación de GUS y proporciona una comparación de la expresión con un promotor constitutivo sin un intrón para la potenciación. El casete del transgén de pMON33449 está compuesto por una variante del promotor CaMV 35S (P-E35S:1:52, la SEQ ID NO: 1117) y proporciona un comparador adicional que carece de un intrón.

Células de protoplasto, derivadas del tejido de la hoja de trigo se transformaron utilizando procedimientos de transformación basados en PEG conocidos en la técnica. En resumen, cada construcción de prueba y control se usó para proporcionar un molde para la amplificación del casete del transgén que comprende cada construcción. El amplicón resultante se fraccionó por tamaño en un gel de agarosa y el ADN del amplicón se escindió del gel. El ADN del amplicón se extrajo del fragmento de gel utilizando procedimientos conocidos en la técnica y cuantificados mediante espectrofotometría. Las células de protoplastos se transformaron utilizando procedimientos de PEG conocidos en la técnica y utilizando 0,1 pico-moles de ADN del amplicón de la PCR. Se realizaron de dos a cuatro repeticiones para cada transformación y se determinó la expresión promedio impartida por cada construcción. La expresión de GUS media observada para cada amplicón derivado de la construcción se normalizó con respecto a la expresión observada para el amplicón derivado de pMON19469 que comprende el elemento del intrón, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102). Las tablas 22 siguientes muestran la expresión de GUS promedio normalizada impartida a amplicones derivados de las construcciones presentadas en la Tabla 19 del Ejemplo 12 en relación con la expresión de GUS promedio impartida a amplicones derivados de los plásmidos de control descritos anteriormente usando 0,1 pmol de amplicón.

Tabla 22. Potenciación mediada por intrones de la expresión de GUS en protoplastos de trigo en relación con I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102).

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación estándar
pMON140768	I-SETit.LSm8-1-1:1:2	243	2,26	0,51
pMON140750	I-SETit.60S_ L10A1-5-1:1:2	215	2,14	0,62
pMON65328	I-Os.Act1-1:1:19	1113	2,06	0,96
pMON138844	I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2	224	1,92	0,29
pMON138806	I-SETit.GRP-1-1:1:1	242	1,81	0,64
pMON138828	1-SETit.14-3-3D-2-1:1:1	193	1,75	0,71
pMON138814	I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2	194	1,71	0,26
pMON140754	I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2	234	1,66	0,61
pMON140762	I-SETit.LSm8-4-1:1:2	246	1,6	0,52
pMON140767	I-SETit.LSm8-2-1:1:1	244	1,55	0,26
pMON140769	I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2	233	1,53	0,52
pMON138834	I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2	225	1,44	0,67
pMON140758	I-SETit.ASA2-3-1:1:2	216	1,37	0,25
pMON138847	I-SETit.60S_ L10A1-2-1:1:2	212	1,34	1,03
pMON140756	I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2	231	1,33	0,53
pMON138830	I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2	184	1,2	0,23
pMON138829	1-SETit.14-3-3B-2-1:1:1	183	1,18	0,41
pMON138848	I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2	219	1,17	0,1
pMON138826	I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2	180	1,12	0,23
pMON140760	I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2	235	1,12	0,49
pMON138822	I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2	191	1,1	0,33
pMON138803	I-SETit.TubA3_2-1:1:1	266	1,08	0,19
pMON138791	I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2	203	1,06	0,13

(continuación)

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación estándar
pMON138805	I-SETit.TubA2_3-1:1:1	264	1,03	0,34
pMON138817	I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2	189	1,03	0,16
pMON140766	I-SETit.Prx3-1-1:1:2	258	1,03	0,45
pMON138783	I-SETit.DnaJ_1-1:1:2	218	1,02	0,43
pMON19469	I-Zm.DnaK-1:1:1	1102	1	0,96
pMON138846	I-SETit.eIF5A2-3-1:1:2	229	0,99	0,62
pMON138819	I-SETit.GAD_2-1:1:2	238	0,98	0,4
pMON140753	I-SETit.eIF5A3-1-1:1:1	232	0,98	0,16
pMON138835	1-SETit.14-3-3E-2-1:1:1	197	0,97	0,17
pMON138836	I-SETit.14-3-3E-3-1:1:2	198	0,95	0,36
pMON138837	I-SETit.60S_L10A1-1-1:1:2	211	0,93	0,57
pMON138813	I-SETit.14-3-3A-5-1:1:2	182	0,92	0,32
pMON138849	I-SETit.eIF5A2-4-1:1:2	230	0,9	0,3
pMON138809	I-SETit.40S-7S-3_1-1:1:2	208	0,88	0,41
pMON140770	I-SETit.SBD-1-1:1:2	259	0,84	0,5
pMON138811	I-SETit.TubA3_1-1:1:1	265	0,83	0,12
pMON138833	I-SETit.eIF5A1-2-1:1:2	223	0,83	0,56
pMON140761	I-SETit.SBD-2-1:1:1	260	0,82	0,18
pMON138832	I-SETit.14-3-3C-4-1:1:2	190	0,77	0,44
pMON1 40757	I-SETit.ClpD-1-1:1:1	217	0,77	0,52
pMON140759	I-SETit.SBD-3-1:1:2	261	0,76	0,36
pMON138812	I-SETit.PGK3_1-1:1:2	247	0,75	0,45
pMON140763	I-SETit.eIF5A3-5-1:1:2	236	0,75	0,22
pMON138824	1-SETit.14-3-3A-2-1:1:1	179	0,74	0,39
pMON138839	I-SETit.eIF5A2-2-1:1:3	228	0,73	0,12
pMON33449	Sin intrón		0,68	0,47
pMON138841	I-SETit.14-3-3E-5-1:1:2	200	0,67	0,35
pMON138827	I-SETit.14-3-3D-4-1:1:3	195	0,63	0,45
pMON138815	I-SETit.GAD_3-1:1:2	239	0,6	0,15
pMON25455 EXP-Os.Act1 (SEQ ID NO: 1098)	EXP-Os.Act1		0,57	0,49
pMON138804	I-SETit.PGK3_2-1:1:1	248	0,56	0,42
pMON138823	1-SETit.14-3-3C-2-1:1:1	188	0,54	0,21
pMON140752	I-SETit.60S_L10A1-4-1:1:1	214	0,52	0,46
pMON140755	I-SETit.Wx1-1-1:1:2	267	0,52	0,41
pMON138816	I-SETit.14-3-3A-4-1:1:2	181	0,51	0,2
pMON138808	I-SETit.GAD_1-1:1:2	237	0,5	0,42
pMON138820	I-SETit.14-3-3B-4-1:1:2	185	0,5	0,35
pMON138831	I-SETit.14-3-3C-1-1:1:1	187	0,49	0,42
pMON138838	I-SETit.eIF5A2-1-1:1:2	227	0,49	0,39
pMON138792	I-SETit.40S-7S-1_2-1:1:2	202	0,47	0,49
pMON138799	I-SETit.TubA2_1-1:1:1	262	0,47	0,15
pMON140765	I-SETit.Grf1-3-1:1:1	241	0,47	0,38
pMON138843	I-SETit.14-3-3D-5-1:1:2	196	0,46	0,49
pMON140771	I-SETit.LSm8-3-1:1:1	245	0,43	0,25
pMON138789	I-SETit.PIP2-2_3-1:1:2	254	0,42	0,26

(continuación)

Construcción	Anotación del Intrón	Intrón SEQ ID NO:	Media	Desviación estándar
pMON138794	I-SETit.40S-7S-1_1-1:1:2	201	0,4	0,28
pMON138788	I-SETit.40S-7S-1_4-1:1:2	204	0,39	0,32
pMON138840	I-SETit.60S_ L10A1-3-1:1:2	213	0,39	0,35
pMON1 40751	I-SETit.eIF5A1-5-1:1:2	226	0,39	0,48
pMON138785	I-SETit.PIP1-4_3-1: 1:2	252	0,38	0,33
pMON8677	Sin intrón		0,38	0,36
pMON138821	I-SETit.14-3-3B-5-1:1:2	186	0,37	0,23
pMON138825	I-SETit.14-3-3D-1-1:1:2	192	0,37	0,31
pMON138797	I-SETit.PIP1-1_1-1:1:1	250	0,33	0,39
pMON140764	I-SETit.Prx17-2-1:1:1	257	0,33	0,41
pMON138786	I-SETit.eEF1 g_1-1:1:2	220	0,32	0,29
pMON138818	I-SETit.GAD_4-1:1:2	240	0,32	0,09
pMON138802	I-SETit.40S-7S-2_3-1:1:1	206	0,3	0,22
pMON138801	I-SETit.TubA2_2-1:1:1	263	0,29	0,2
pMON138793	I-SETit.PIP1_1_2-1:1:1	249	0,24	0,33
pMON138807	I-SETit.40S-7S-2_4-1:1:1	207	0,24	0,3
pMON138800	I-SETit.40S-7S-3_3-1:1:2	210	0,22	0,11
pMON138795	I-SETit.PIP2-5_3-1: 1:2	256	0,21	0,19
pMON138790	I-SETit.PIP2-5_2-1: 1:2	255	0,19	0,18
pMON138796	I-SETit.PIP1-1_3-1: 1:2	251	0,18	0,19
pMON138810	I-SETit.40S-7S-3_2-1:1:2	209	0,17	0,16
pMON138787	I-SETit.eEF1 g_4-1:1:3	221	0,13	0,17
pMON138784	I-SETit.PIP2-2 _2-1:1:2	253	0,1	0,15
pMON138798	I-SETit.40S-7S-2_2-1:1:1	205	0,09	0,09
Sin ADN			0	0
pMON138842	I-SETit.eIF5AI-1-1:1:1	222		
pMON138845	I-SETit.14-3-3E-4-1:1:2	199		

Como se observó en células de protoplasto de maíz, muchos de los elementos de prueba del intrón proporcionaron una potenciación de la expresión del transgén en relación con los controles sin intrón. Se observó una potenciación mejorada de la expresión de GUS, en relación con el elemento del intrón, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO: 1102) utilizando los elementos del intrón, I-SETit.LSm8-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 243), I-SETit.60S_L10A1-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 215), I-SETit.eIF5A1-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 224), I-SETit.GRP-1-1:1:1 (SEQ ID NO: 242), I-SETit.14-3-3D-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 193), I-SETit.14-3-3D-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 194), I-SETit.eIF5A3-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 234), I-SETit.LSm8-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 246), I-SETit.LSm8-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 244), I-SETit.eIF5A3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 233), I-SETit.eIF5A1-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 225), I-SETit.ASA2-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 216), I-SETit.60S_L10A1-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 212), I-SETit.eIF5A2-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 231), I-SETit.14-3-3B-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 184), I-SETit.14-3-3B-2-1:1:1 (SEQ ID NO: 183), I-SETit.DnaJ3-2-1:1:2 (SEQ ID NO: 219), I-SETit.14-3-3A-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 180), I-SETit.eIF5A3-4-1:1:2 (SEQ ID NO: 235), I-SETit.14-3-3C-5-1:1:2 (SEQ ID NO: 191), I-SETit.TubA3_2-1:1:1 (SEQ ID NO: 266), I-SETit.40S-7S-1_3-1:1:2 (SEQ ID NO: 203), I-SETit.TubA2_3-1:1:1 (SEQ ID NO: 264), I-SETit.14-3-3C-3-1:1:2 (SEQ ID NO: 189), I-SETit.Prx3-1-1:1:2 (SEQ ID NO: 258) y I-SETit.DnaJ_1-1:1:2 (SEQ ID NO: 218).

Ejemplo 15. Ensayo de 3 'molécula de terminación de la transcripción o 3' UTR en protoplastos.

Las moléculas de terminación de la transcripción 3 'o las UTR 3' se aíslan del mijo de cola de zorra *(Setaria italica* (L.) Beauv) y se clonan en vectores de base de plantas utilizando procedimientos conocidos en la técnica para probar la efectividad de la 3' UTR en la transcripción de terminación, así como potenciar la expresión de un transgén.

Las 3' UTR útiles para proporcionar la expresión de un transgén en plantas se identifican basándose en la expresión de marcadores de secuencia expresados (EST) en bibliotecas de ADNc preparadas a partir de ARN mensajero aislado de semillas, flores y otros tejidos obtenidos de panizo común *(Setaria italica* (L.) Beauv). Las bibliotecas de ADNc están hechas de tejidos aislados de *S. italica* usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica a partir de tejidos de flores, semillas, hojas y raíces. Los ADNc resultantes se secuencian utilizando diversos

procedimientos de secuenciación conocidos en la técnica. Los EST resultantes se ensamblan en grupos utilizando software bioinformático tal como clc_ref_assemble_complete versión 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). Se determinó la abundancia de transcritos de cada grupo contando el número de lecturas de ADNc para cada grupo.

Las 3' UTR identificadas pueden estar compuestas de secuencias derivadas de una secuencia de ADNc así como secuencias derivadas de ADN genómico. La secuencia de ADNc se usa para diseñar cebadores, que luego se utilizan con GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) Las bibliotecas construidas siguiendo el protocolo del fabricante para clonar la región 3 'de la secuencia de ADN genómica correspondiente para proporcionar una secuencia de terminación más larga. El análisis de la abundancia relativa de transcritos, ya sea por conteos directos o por conteos normalizados de lecturas de secuencias observadas para cada biblioteca de tejidos, se puede usar para inferir propiedades sobre patrones de expresión. Por ejemplo, algunas 3' UTR pueden encontrarse en transcritos que se observan en mayor abundancia en el tejido de la raíz a diferencia de la hoja. Esto sugiere que el transcrito está muy expresado en la raíz y que las propiedades de expresión de la raíz pueden ser atribuibles a la regulación de la transcripción del promotor, la secuencia líder, los intrones o las 3' UTR. Pruebas empíricas de 3' UTR identificadas por las propiedades de expresión dentro de órganos específicos, tejidos o tipos de células pueden dar como resultado la identificación de 3' UTR que mejoran la expresión en esos órganos, tejidos o tipos de células específicos.

Las secuencias 3' UTR aisladas de *S. italica* se presentan como SEQ ID NOS: 268 a 276 y SEQ ID NOS: 779 a 924. La Tabla 23 siguiente presenta las 3' UTR identificadas como útiles para el control de la expresión y la potenciación de la expresión de la raíz o la expresión constitutiva.

Tabla 23. Terminación de la transcripción o elementos 3' UTR derivados de *S. italica.*

Comentario	la SEQ ID NO:	Descripción
T-SETit.Act1-1:1:1	268	Actina 1
T-SETit.Act8-1:1:1	269	Actina 8
T-SETit.Ams 1-1:1:1	270	S-adenosilmetionina sintetasa 1
T-SETit.Ctpt-1:1:2	271	Triosa fosfato/fosfato translocador, precursora de cloroplasto
T-SETit.Fba-1:1:1	272	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fnr-1:1:1	273	Ferredoxin-NADP+ reductasa
T-SETit.Mes2-1:1:1	274	Metionina sintasa 2
T-SETit.Ntr-1:1:1	275	Transportador de nitrito
T-SETit.Sus2-1:1:1	276	Sacarosa sintasa 2
T-SETit.36384-1:1:1	779	Grupo 36384
T-SETit.37025-1:1:1	780	Grupo 37025
T-SETit.37470-1:1:1	781	Grupo 37470
T-SETit.Ams2-1:1:1	782	S-adenosilmetionina sintetasa 2
T-SETit.Atps-1:1:1	783	Subunidad gamma de la ATP sintasa
T-SETit.Cab-1:1:1	784	Proteína de unión a clorofila a/b
T-SETit.Cab1-1:1:1	785	Proteína de unión a clorofila a/b
T-SETit.Ctpt-1:1:1	786	Triosa fosfato/fosfato translocador, precursora de cloroplasto
T-SETit.DnaK-1:1:1	787	Proteína de choque térmico
T-SETit.Fba-1:1:2	788	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fba-1:1:3	789	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Fba-1:1:4	790	Fructosa-bisfosfato aldolasa
T-SETit.Gapdh-1:1:1	791	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
T-SETit.MES2_nno-1:1:1	792	Metionina sintasa 2
T-SETit.Oep-1:1:1	793	Proteína evolutiva del oxígeno de 33kDa
T-SETit.Pea-1:1:1	794	ATPasa de exportación de protones
T-SETit.Pod-1:1:1	795	piruvato ortofosfato diquinasa
T-SETit.Ppc-1:1:1	796	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
T-SETit.Psi-K-1:1:1	797	Subunidad del centro de reacción del fotosistema I
T-SETit.Psi-L-1:1:1	798	Subunidad del centro de reacción del fotosistema 1

(continuación)

Comentario	la SEQ ID NO:	Descripción
T-SETit.Rfe-s-1:1:1	799	Rieske Fe-S
T-SETit.TubA-1:1:1	800	Tubulina A
T=contig00388	801	Raíz 3' UTR
T=contig05482	802	Raíz 3' UTR
T=contig08555	803	Raíz 3' UTR
T=contig08556	804	Raíz 3' UTR
T=contig09485	805	Raíz 3' UTR
T=contig13749	806	Raíz 3' UTR
T=contig16157	807	Raíz 3' UTR
T=contig18936	808	Raíz 3' UTR
T=contig18994	809	Raíz 3' UTR
T=contig21387	810	Raíz 3' UTR
T=contig23385	811	Raíz 3' UTR
T=contig24188	812	Raíz 3' UTR
T=contig24188	813	Raíz 3' UTR
T=contig24832	814	Raíz 3' UTR
T=contig24890	815	Raíz 3' UTR
T=contig24916	816	Raíz 3' UTR
T=contig25097	817	Raíz 3' UTR
T=contig25509	818	Raíz 3' UTR
T=contig25584	819	Raíz 3' UTR
T=contig26532	820	Raíz 3' UTR
T=contig28013	821	Raíz 3' UTR
T=contig29922	822	Raíz 3' UTR
T=contig34261	823	Raíz 3' UTR
T=contig34311	824	Raíz 3' UTR
T=contig34749	825	Raíz 3' UTR
T=contig35408	826	Raíz 3' UTR
T=contig35550	827	Raíz 3' UTR
T=contig35785	828	Raíz 3' UTR
T=contig35943	829	Raíz 3' UTR
T=contig36050	830	Raíz 3' UTR
T=contig36266	831	Raíz 3' UTR
T=contig36378	832	Raíz 3' UTR
T=contig36502	833	Raíz 3' UTR
T=contig36728	834	Raíz 3' UTR
T=contig36811	835	Raíz 3' UTR
T=contig36883	836	Raíz 3' UTR
T=contig37316	837	Raíz 3' UTR
T=contig37476	838	Raíz 3' UTR
T=contig37510	839	Raíz 3' UTR
T=contig37704	840	Raíz 3' UTR
T=contig37883	841	Raíz 3' UTR
T=contig37920	842	Raíz 3' UTR
T=contig37959	843	Raíz 3' UTR
T=contig37976	844	Raíz 3' UTR
T=contig38003	845	Raíz 3' UTR

(continuación)

Comentario	la SEQ ID NO:	Descripción
T-SETIT-28JUL09-CLUS30 16_12	846	Raíz 3' UTR
T-10SETIT-28JUL09-CLUS1332_4	847	3' UTR Constitutivo
T-17SETIT-28JUL09-CLUS1910_15	848	3' UTR Constitutivo
T-7SETIT-28JUL09-CLUS2844_11	849	3' UTR Constitutivo
T=contig00006	850	3' UTR Constitutivo
T=contig00142	851	3' UTR Constitutivo
T=contig00191	852	3' UTR Constitutivo
T=contig00205	853	3' UTR Constitutivo
T=contig00242	854	3' UTR Constitutivo
T=contig00263	855	3' UTR Constitutivo
T=contig01883	856	3' UTR Constitutivo
T=contig02157	857	3' UTR Constitutivo
T=contig02856	858	3' UTR Constitutivo
T=contig02883	859	3' UTR Constitutivo
T=contig04253	860	3' UTR Constitutivo
T=contig05397	861	3' UTR Constitutivo
T=contig05720	862	3' UTR Constitutivo
T=contig10626	863	3' UTR Constitutivo
T=contig10874	864	3' UTR Constitutivo
T=contig11193	865	3' UTR Constitutivo
T=contig14970	866	3' UTR Constitutivo
T=contig26892	867	3' UTR Constitutivo
T=contig32186	868	3' UTR Constitutivo
T=contig32187	869	3' UTR Constitutivo
T=contig33439	870	3' UTR Constitutivo
T=contig33682	871	3' UTR Constitutivo
T=contig34270	872	3' UTR Constitutivo
T=contig34378	873	3' UTR Constitutivo
T=contig35132	874	3' UTR Constitutivo
T=contig35270	875	3' UTR Constitutivo
T=contig35388	876	3' UTR Constitutivo
T=contig35412	877	3' UTR Constitutivo
T=contig35488	878	3' UTR Constitutivo
T=contig35982	879	3' UTR Constitutivo
T=contig36384	880	3' UTR Constitutivo
T=contig36588	881	3' UTR Constitutivo
T=contig36702	882	3' UTR Constitutivo
T=contig36980	883	3' UTR Constitutivo
T=contig36992	884	3' UTR Constitutivo
T=contig36993	885	3' UTR Constitutivo
T=contig37025	886	3' UTR Constitutivo
T=contig37162	887	3' UTR Constitutivo
T=contig37351	888	3' UTR Constitutivo
T=contig37386	889	3' UTR Constitutivo
T=contig37448	890	3' UTR Constitutivo
T=contig37456	891	3' UTR Constitutivo
T=contig37638	892	3' UTR Constitutivo
T=contig37732	893	3' UTR Constitutivo

(continuación)

Comentario	la SEQ ID NO:	Descripción
T=contig37897	894	3' UTR Constitutivo
T=contig37927	895	3' UTR Constitutivo
T=contig37962	896	3' UTR Constitutivo
T=contig37980	897	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS11107_1	898	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 11705_1	899	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 11899_1	900	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 12698_2	901	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS13580_1	902	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 1404_1	903	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 14743_1	904	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 181186_1	905	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS19095_1	906	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 1910_ 13	907	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 1910_14	908	3' UTR Constitutivo
T-SETIT28JUL09CLUS 1910_16	909	3' UTR Constitutivo
T-SETIT28JUL09CLUS1910_17	910	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS 1910_18	911	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS1910_19	912	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS2157_4	913	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS2166_1	914	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS243_3	915	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS3485_1	916	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS364_1	917	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS36567_1	918	3' UTR Constitutivo
T-SETIT -28JUL09-CLUS42130_1	919	3' UTR Constitutivo
T-SETIT -28JUL09-CLUS52844_1	920	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS7004_1	921	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS83_23	922	3' UTR Constitutivo
T-SETIT-28JUL09-CLUS937_1	923	3' UTR Constitutivo
T-SETIT -28JUL09-CLUS95524_1	924	3' UTR Constitutivo

Las 3' UTR de la presente invención, presentadas como SEQ ID NOS: 268 a 276 y SEQ ID NOS: 779 a 924 se prueban en ensayos de protoplastos transitorios. Se utiliza un promotor constitutivo u otro tipo para dirigir la expresión de un transgén como GUS. Los vectores de plantas se construyen utilizando procedimientos conocidos en la técnica en los que se utiliza un casete del transgén para probar las propiedades de la 3' UTR así como para proporcionar un transcrito que se puede analizar para comprender la efectividad de la 3' UTR en el control de la expresión del transgén. y procesamiento del transcrito resultante.

Para el ensayo transitorio de la prueba de efectividad de la 3' UTR, se construyó un vector de planta básico utilizando procedimientos conocidos en la materia. La 3' UTR se clona en un vector de planta básico que comprende un primer casete del transgén para probar la 3' UTR que comprende, un promotor constitutivo tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5’ a un elemento líder, L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114), unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de *Zea mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1 SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de la β-glucuronidasa (GUS) que bien tiene un intrón procesable (GUS-2, la SEQ ID NO: 1091) o ningún intrón (GUS-1, la SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a la región de terminación en 3’ de la nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) o a la región de terminación en 3' del gen de la proteína de transferencia de lípidos del arroz (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID NO: 1089); un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por grupo del elemento regulador de la transcripción de la Actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098), o alternativamente, el antibiótico kanamicina (impulsado por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de la Actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) y una región del límite izquierdo procedente de *A. tumefaciens*.

Se realizan varias observaciones experimentales para caracterizar la 3' UTR en el ensayo de protoplastos. Por ejemplo, el nivel de expresión se determina utilizando la tinción GUS como se describe en los ejemplos anteriores para evaluar la cantidad de proteína expresada y se normaliza utilizando procedimientos conocidos en la técnica para establecer una comparación en los niveles de expresión de proteínas de la prueba 3' UTR en relación con el control T-AGRtu.nos. El ARN total se extrae y se sondea en transferencias Northern con sondas específicas de la secuencia codificante de GUS para evaluar el tamaño o los tamaños de los transcritos producidos en las células de protoplastos para determinar la efectividad de la 3' UTR en la terminación de la transcripción. Como alternativa, la secuencia 3' de la 3' UTR se puede usar para cebar las reacciones de amplificación del ARN transcrito de manera inversa para detectar los transcritos en los que se ha producido una lectura más allá de la 3' UTR. El ARN total analizado en transferencias Northern también puede revelar la abundancia relativa de la transcripción cuando se compara con el control T-AGRtu.nos.

Ejemplo 16. Ensayo de secuencias de terminación de la transcripción o 3' UTR en plantas estables.

Las 3' UTR, presentadas como SEQ ID NOS: 268 a 276 y SEQ ID NOS: 779 a 924 se probaron en plantas de maíz transformadas de forma estable. Para el ensayo de plantas estables de la 3' UTR, un vector de transformación de plantas de expresión en GUS se construyó utilizando procedimientos conocidos en la técnica similares a las construcciones descritas en los ejemplos anteriores. La 3' UTR se clona en un vector de planta básico que comprende un primer casete del transgén para probar la 3' UTR que comprende, un promotor constitutivo tal como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114), o alternativamente, un promotor de la raíz como el promotor de la proteína de transferencia de lípidos, P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093), unido operativamente en 5' al elemento líder, L-Os.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 1094) unido operativamente a un intrón procedente de la proteína de choque térmico HSP70 de Zea mays (I-Zm.DnaK-1:1:1 SEQ ID NO: 1102), unido operativamente a una secuencia codificante de la β-glucuronidasa (GUS) que bien tiene un intrón procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) o ningún intrón (GUS-1, SEQ ID NO: 1090), unido operativamente a una región de terminación 3' de prueba; un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por grupo del elemento regulador de la transcripción de la Actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098), o alternativamente, el antibiótico kanamicina (impulsado por el grupo de elementos reguladores de la transcripción de la Actina 1 del arroz, SEQ ID NO: 1098) y una región del límite izquierdo procedente de *A. tumefaciens*.

Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar plantas de maíz. Los transformantes de copia única o bajo número de copias se seleccionaron para comparación con plantas transformadas de copia única o bajo número de copias, transformadas con un vector de transformación de plantas idéntico al vector de prueba pero que comprende una 3' UTR bien caracterizada, como la región de terminación 3' de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088) unida operativamente al transgén GUS.

Las plantas de maíz se transformaron como se ha descrito anteriormente o mediante procedimientos de transformación *mediados* por *Agrobacterium* conocidos en la técnica. El tejido se recolectó en diferentes momentos del desarrollo y de diferentes órganos y se analizó la actividad de GUS para evaluar la cantidad de proteína expresada en cada tejido en diferentes ventanas de tiempo de desarrollo y se comparó con la expresión de GUS en plantas transformadas del control. El ARN total se extrajo de los diferentes tejidos de interés y se sondeó en transferencias Northern con sondas específicas de la secuencia de codificación de GUS para evaluar el tamaño o los tamaños de los transcritos producidos dentro de cada uno de los tejidos seleccionados para determinar la efectividad de la 3' UTR en la terminación de la transcripción. y la abundancia relativa de mensaje en cada tejido seleccionado. Como alternativa, la secuencia 3' de la 3' UTR se puede usar para cebar las reacciones de amplificación del ARN transcrito de manera inversa para detectar transcritos en los que se ha realizado una lectura detallada de la 3' UTR o evaluar la cantidad de transcritos expresados en cada tejido. Las 3' UTR más útiles y efectivas se seleccionan para su uso en casetes transgénicos en los que se expresan genes de importancia agronómica.

Ejemplo 17: Análisis de la potenciación mediada por 3' UTR en la actividad de GUS en plantas de maíz transgénicas.

Los vectores binarios de plantas se construyeron utilizando procedimientos conocidos en la técnica similares a los descritos en el ejemplo anterior y se usan para transformar plantas de maíz para probar la efectividad de las 3' UTR seleccionadas.

Los vectores de transformación de plantas se utilizaron para transformar plantas de maíz para probar la efectividad en el control de la expresión del transgén GUS, cuando es impulsado por un promotor constitutivo, (P-FMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1115) + L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114)) o un promotor de raíz mejorado, ((E-CaMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1116) + P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) + L-Os.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 1094)). Los vectores de expresión de plantas resultantes contienen una región del límite derecho de *Agrobacterium tumefaciens,* un primer casete de transgenes para probar la 3' UTR que comprende un promotor constitutivo, (P-FMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1115) + L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114)) o un promotor de raíz mejorado, ((E-CaMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1116) + P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) + L-Os.Rcc3-1: 1:2 (SEQ ID NO: 1094)), unido operativamente en 5' a una secuencia de codificación de la β-glucuronidasa (GUS) que posee un intrón

procesable (GUS-2, SEQ ID NO: 1091) unido operativamente a la 3' UTR de prueba; un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de las células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por el promotor de la Actina 1 del arroz), y una región del límite izquierdo de *A. tumefaciens.* La tabla 24 siguiente muestra las construcciones de prueba y el promotor correspondiente y la 3' UTR.

Tabla 24. Construcciones de prueba de terminación de la transcripción o 3' UTR en las que GUS está impulsado por un promotor constitutivo o un promotor de raíz mejorado.

Prueba de la 3' UTR	construcciones constitutivas P-FMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1115) L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114)	Construcciones de raíz potenciadas E-CaMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1116) P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO:1093) L-Os.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO:1094)
T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	pMON126964	pMON126965
T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	pMON126966	pMON126967
T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	pMON126968	pMON126969
T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	pMON126974	pMON126975
T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	pMON126976	pMON126977
T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	pMON126978	pMON126979
T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269)	pMON127033	
T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268)	pMON127035	
T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270)	pMON127041	

Las plantas de maíz se transforman utilizando procedimientos *mediados por Agrobacterium* conocidos en la técnica y como se describe en los ejemplos anteriores. Las plantas de maíz transformadas se analizan para determinar la actividad GUS como se describe en los ejemplos anteriores. Las tablas 25 y 26 muestran el nivel promedio de expresión de GUS observado en diversos tejidos aislados de las plantas transformadas en las que el promotor constitutivo, ((P-FMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1115) + L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1114)), impulsó la expresión del transgén GUS. Las tablas 27 y 28 muestran el nivel promedio de expresión de GUS observado en tejidos aislados de las plantas transformadas en las que el promotor de la raíz potenciado, ((E-CaMV.35S-enh-1:1:1 (SEQ ID NO: 1116) + P-Os.Rcc3-1:1:24 (SEQ ID NO: 1093) + L-Os.Rcc3-1:1:2 (SEQ ID NO: 1094)), impulsó la expresión del transgén GUS. La potenciación de la expresión impartida por la 3' UTR se infirió por la comparación relativa entre las construcciones transformadas que comprenden cada UTR y el promotor específico.

Tabla 25. Expresión de R_0 GUS promedio de un promotor constitutivo que impulsa GUS con 3' UTR diferentes.

Construcción	Anotación 3' de UTR	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON126964	T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	45,54	136,70	103,51	112,24	151,17	304,15
pMON126966	T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	12,01	nd	123,25	33,30	140,51	100,88
pMON126968	T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	9,76	nd	108,38	231,03	417,04	157,53
pMON126974	T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	7,74	nd	53,30	163,74	357,60	456,63
pMON126976	T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	nd	nd	454,44	235,62	268,63	235,73
pMON126978	T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	nd	158,85	45,89	60,97	250,87	121,41
pMON127033	T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269)	nd	nd	203,77	129,06	240,13	460,74
pMON127035	T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268)	117,02	174,21	557,50	412,92	511,88	531,34
pMON127041	T-SETit.Ams 1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270)	842,04	564,84	246,90	986,33	225,68	279,58

La expresión promedio del gen GUS se efectuó mediante 3' UTR diferentes. La expresión de GUS impulsada por el promotor constitutivo pareció verse afectada por el uso de diferentes 3' UTR, Particularmente con respecto a la expresión de la hoja. Una potenciación de la expresión de la hoja en las etapas V3 y V7 podría verse cuando la 3' UTR, T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271) se utilizaron en combinación con el promotor constitutivo. Se proporcionó la potenciación para las 3 etapas de la hoja al combinar el promotor constitutivo con las 3' UTR, T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274), T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268) y T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270). Se observo la potenciación de la expresión en la raíz usando el promotor constitutivo a lo largo de las 3 etapas usando la 3' UTR, T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270) y en la etapa VT usando las 3' UTR, T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274),

T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269) y T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268).

Tabla 26. Expresión de R_0 GUS promedio de un promotor constitutivo que impulsa GUS con 3' UTR diferentes.

Construcción	Anotación 3' de UTR	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON126964	T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	140,38	96,86	36,85	139,47
pMON126966	T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	166,05	110,71	275,98	223,52
pMON126968	T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	219,71	101,88	72,49	235,36
pMON126974	T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	350,21	419,08	107,48	243,22
pMON126976	T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	401,38	370,21	174,26	366,92
pMON126978	T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	41,62	59,81	115,59	168,81
pMON127033	T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269)	324,04	435,63	133,10	262,52
pMON127035	T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268)	408,61	707,00	119,39	419,52
pMON127041	T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270)	346,60	246,92	134,79	251,23

Se pudo observar la potenciación de la expresión de GUS en la antera y el polen cuando se usa un promotor constitutivo para las 3' UTR, T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273), T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274), T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269), T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268) y T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270). Se pudo observar la potenciación de la expresión de GUS en el endospermo cuando se usa un promotor constitutivo para la 3' UTR, T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276). Se pudo observar la potenciación de la expresión de GUS en el embrión cuando se usa un promotor constitutivo en la mayoría de las 3' UTR en relación con el expresor más bajo, T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275). Se observó la mayor cantidad de potenciación en el embrión utilizando las 3' UTR, T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274) y T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268).

La lectura se evaluó usando procedimientos de la PCR conocidos en la técnica. Aquellas 3' UTR que demuestran cierta lectura en el ensayo fueron T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275), T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276), T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271), T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274) y T-SETit.Act1-1:1:1 (SEQ ID NO: 268). Aquellas 3' UTR en las que no se observó lectura fueron T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273), T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272), T-SETit.Act8-1:1:1 (SEQ ID NO: 269) y T-SETit.Ams1-1:1:1 (SEQ ID NO: 270).

Tabla 27. Expresión de R_0 GUS promedio de un promotor de raíz potenciado que impulsa GUS con diferentes 3' UTR.

Construcción	Anotación 3' de UTR	Raíz V3	Raíz V7	Raíz VT	Hoja V3	Hoja V7	Hoja VT
pMON126965	T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	7,86	11,39	8,34	0,00	5,60	8,89
pMON126967	T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	67,45	44,80	8,98	0,00	0,00	0,00
pMON126969	T-SETit.Ctpt -1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	35,07	28,96	6,28	7,44	5,07	0,00
pMON126975	T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	45,53	12,99	10,67	81,88	0,00	0,00
pMON126977	T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	16,64	50,03	23,55	0,00	20,47	0,00
pMON126979	T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	30,95	19,79	14,22	0,00	7,47	0,00

Usando un promotor de raíz potenciado, se observó la potenciación en la raíz en la etapa V3 y V7 utilizando la 3' UTR, T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276). También se pudo observar una leve mejora de la expresión de la raíz cuando se usan las 3' UTR, T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271) (etapa V3 y V7), T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273) (etapa V3) y T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272) (etapa V3). Se observó una mejora en la expresión de la hoja cuando se usó el promotor de raíz mejorado en combinación con T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273).

Tabla 28. Expresión de R_0 GUS promedio de un promotor de raíz potenciado que impulsa GUS con diferentes 3' UTR.

Construcción	Anotación 3' de UTR	Antera VT	Estigma VT	Embrión 21 DAP	Endospermo 21 DAP
pMON126965	T-SETit.Ntr-1:1:1 (SEQ ID NO: 275)	6,59	5,16	0,00	0,00
pMON126967	T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276)	12,24	0,00	115,97	21,68
pMON126969	T-SETit.Ctpt-1:1:2 (SEQ ID NO: 271)	0,00	0,00	7,20	10,77
pMON126975	T-SETit.Fnr-1:1:1 (SEQ ID NO: 273)	5,71	12,57	7,60	0,00
pMON126977	T-SETit.Mes2-1:1:1 (SEQ ID NO: 274)	7,28	0,00	0,00	5,18
pMON126979	T-SETit.Fba-1:1:1 (SEQ ID NO: 272)	11,25	0,00	0,00	8,38

Se observó la potenciación de la expresión en el embrión para la 3' UTR, T-SETit.Sus2-1:1:1 (SEQ ID NO: 276) cuando se combina con el promotor de raíz potenciado. Los elementos 3' UTR presentados anteriormente tuvieron cada uno un efecto sobre la expresión de GUS cuando se combinaron en un enlace operable con éter, un promotor constitutivo o un promotor de raíz potenciado.

Ejemplo 18. Identificación y ensayo de péptidos de tránsito de cloroplastos (CTP).

Es bien sabido que las células de los organismos eucariotas, y más particularmente las células vegetales, contienen distintos compartimentos subcelulares, u orgánulos, Delimitados por sistemas característicos de membrana y realizando funciones especializadas dentro de la célula. En las células de la hoja fotosintética de las plantas superiores, los orgánulos más conspicuos son los cloroplastos, que existen de forma semiautónoma dentro de la célula, Contienen su propio sistema genético y maquinaria de síntesis de proteínas, pero se basan en una estrecha cooperación con el sistema núcleo-citoplasmico en sus actividades de desarrollo y biosintéticas.

La mayoría de las proteínas del cloroplasto están codificadas en el ADN nuclear y son los productos de la síntesis de proteínas en los ribosomas citoplasmáticos, Muchos como precursores solubles de peso molecular más alto. Estos precursores a continuación se translocan a través de una o ambas membranas de envoltura del plástido, procesados, y ensamblados en su compartimento del orgánulo final o complejo de holoenzima. Los experimentos de reconstitución *in vitro* utilizando cloroplastos aislados, han demostrado que la captación y el procesamiento de más de cien códigos nucleares, precursores sintetizados citoplásmicamente por los cloroplastos se producen por un mecanismo posterior a la traducción de una manera dependiente de la energía.

La característica más extensa de estas proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo es la pequeña subunidad de la ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) carboxilasa. Este polipéptido se sintetiza en ribosomas citoplásmicos libres como un precursor de 20.000 daltons que contiene una extensión en el extremo amino o un péptido de tránsito de aproximadamente 5-6.000 daltons. Durante o inmediatamente después de la importación del precursor en el cloroplasto, el péptido de tránsito se elimina proteolíticamente en dos pasos por una proteasa soluble, dando como resultado un polipéptido de subunidad pequeña madura de 15.000 daltons. Este polipéptido se ensambla a continuación con una subunidad grande endógena en la holoenzima RuBP carboxilasa funcional.

Estas diferentes propiedades de los péptidos de tránsito se encuentran en la base de los ADN recombinantes, más particularmente en los vectores recombinantes que incluyen una secuencia de ADN que codifica una proteína o polipéptido determinado, particularmente una proteína extraña, para ser introducida y procesada en cloroplastos, así como los procesos para la introducción de dicho polipéptido o proteína extraña en los cloroplastos, por ejemplo, en las membranas de los tilacoides o, preferentemente, en su estroma.

Los péptidos de tránsito de cloroplastos (CTP) se aíslan de *S. italica* basándose en un análisis de las secuencias de agrupación de EST y la homología con las moléculas diana de plástidos conocidas. Los grupos de secuencias EST se utilizan para deducir la secuencia de codificación de moléculas de proteínas dirigidas a cloroplastos. Un fragmento derivado del extremo 5' de la secuencia de codificación de la molécula dirigida al cloroplasto deducida se clonó utilizando procedimientos conocidos en la técnica para producir una molécula quimérica en la que una secuencia de codificación que codifica una molécula dirigida sin cloroplasto se fusiona en el marco en el 5' finaliza con un fragmento de ADN que codifica la supuesta secuencia peptídica de tránsito y se clona en un vector de expresión de la planta para determinar la capacidad y eficiencia de la supuesta CTP para causar la importación de la molécula quimérica en el cloroplasto y el procesamiento posterior de la secuencia peptídica de tránsito en la proteína procesada madura.

Las agrupaciones de secuencias EST de *S. italica* traducidas se comparan con las secuencias de ADN que codifican las moléculas diana de plástidos conocidas de monocotiledóneas como el maíz, sorgo y arroz para determinar la integridad de la secuencia de codificación del agrupamiento y deducir la posible secuencia de aminoácidos del extremo N que será útil como una secuencia de codificación del péptido de tránsito. En algunos ejemplos, la porción más hacia 5' del grupo EST de *S. italica* está ausente. En esas condiciones, se diseña un oligonucleótido degenerativo basado en una alineación de las secuencias codificantes de sorgo y arroz, que codifican homólogos de la secuencia codificante de la proteína de *S. italica* para facilitar la amplificación de la secuencia 5' desconocida.

Las secuencias que codifican las proteínas dirigidas a plástidos útiles en el aislamiento y la clonación de *CTP de S. italica* se presentan como SEQ ID NOS: 1034 a 1060. Las secuencias de proteínas que representan los péptidos dirigidos a los plástidos útiles en la identificación de los CTP de *S. italica* se presentan del 1061 al 1087. Las secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos de tránsito que se muestran en la Tabla 29 a continuación se presentan como SEQ ID NOS: 277 a 284, 289 a 293, 296, 301 a 304 y 307 a 316. Las secuencias de proteínas de los péptidos de tránsito codificados se presentan como SEQ ID NOS: 324 a 350.

Las construcciones para su uso en la clonación de los péptidos de tránsito y las secuencias que codifican el péptido de tránsito, así como las ID de secuencia de péptidos de tránsito, se presentan en la Tabla 29 a continuación.

Tabla 29. Construcciones de plásmidos para su uso en la clonación de péptidos de tránsito de cloroplastos y secuencias codificantes de proteínas y nucleótidos asociadas.

Construcción	Comentario	Proteína SEQ ID NO:	Nucleótido SEQ ID NO:	Descripción
pMON136303	GOI-TS-APX	325	277	Ascorbato peroxidasa
pMON139282	GOI-TS-APX:1:2	325	278	Ascorbato peroxidasa
pMON139283	GOI-TS-APX2:1:1	326	279	Ascorbato peroxidasa
pMON139281	GOI-TS-CNT:1:2	332	280	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa
pMON139291	GOI-TS-DHDPS:1:2	334	281	Precursor de la dihidrodipicolinato sintasa, cloroplástico
pMON139288	GOI-TS-Fe-SD:1:1	335	282	Hierro-superoxidodismutasas, cloroplástico
pMON139287	GOI-TS-PPR:1:1	340	283	Repetición de pentatricopéptidos que contiene proteínas, hipotética
pMON139276	TS-SETit.APG6-1:1:1	324	284	Caseína lítica proteinasa B3 análoga a la proteína de choque térmico
pMON139284	TS-SETit.APX3-1:1:1	327	289	Ascorbato peroxidasa
pMON139278	TS-SETit.ASA2-1:1:1	328	290	Antranilato sintasa subunidad alfa 2
pMON139285	TS-SETit.CC10-1:1:1	329	291	subunidad de 10 Kd de la Cloroplasto chaperonina
pMON136299	TS-SETit.CHoR1-1:1:1	330	292	Regulador de la homeostasis del calcio
pMON139280	TS-SETit.ClpD-1:1:1	331	293	Subunidad de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP
pMON136296	TS-SETit.CR88-1:1:1	333	296	Supuesta proteína de choque térmico
pMON139290	TS-SETit.G-typA-1:1:1	336	301	Proteína de unión a GTP typA
pMON136301	TS-SETit.HDh-1:1:1	337	302	Hidrolasa análoga a haloácido deshalogenasa
pMON139289	TS-SETit.IMP-1:1:1	338	303	Inositol-1-monofosfatasa, hipotética, cloroplástico
pMON136297	TS-SETit.MDH-1:1:1	339	304	hipotética NAD-malato deshidrogenasa
pMON136302	TS-SETit.PSPR-3-1:1:1	341	307	Proteína 3 ribosómica 30S específica de plástido
pMON136291	TS-SETit.RbcS_1-1:1:1	342	308	Subunidad pequeña RUBISCO
pMON136292	TS-SETit.RbcS_2-1:1:1	343	309	Subunidad pequeña RUBISCO
pMON136293	P-SETit.RbcS_3-1:1:1	344	310	Subunidad pequeña RUBISCO
pMON136294	P-SETit.RbcS_4-1:1:1	345	311	Subunidad pequeña RUBISCO

(continuación)

Construcción	Comentario	Proteína SEQ ID NO:	Nucleótido SEQ ID NO:	Descripción
pMON139277	TS-SETit.ShkG-1:1:1	346	312	precursor de la 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa
pMON139286	TS-SETit.SRP43-1:1:1	347	313	proteína de 43 kDa de la partícula de reconocimiento de la señalización, cloroplástico
pMON139279	TS-SETit.TDh-1:1:1	348	314	Treonina deshidratasa biosintética, precursora de cloroplasto
pMON136304	TS-SETit.ThR-1:1:1	349	315	Tiorredoxina
pMON136287	TS-SETit.Wx1-1:1:1	350	316	Almidón sintasa unida a presunto granulado

Las secuencias codificantes del péptido de tránsito presentadas como SEQ ID NOS: 325, 326, 332, 334, 335 y 340 se derivan y se clonan a partir de secuencias de ADN que comprenden un intrón procesable. La construcción de plásmidos pMON136303 está compuesta por la secuencia codificante del péptido de tránsito, GOI-TS-APX, presentadas como SEQ ID NO: 277, que se compone además del elemento, TS-SETit.APX.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 286), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.APX-1:1:1 (SEQ ID NO: 318), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.APX.ex2-1:1:2 (SEQ ID NO: 287). La construcción de plásmidos pMON139282 está compuesta por la secuencia codificante del péptido de tránsito, GOI-TS-APX: 1:2, presentada como SEQ ID NO: 278, que se compone además del elemento, TS-SETit.APX.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 286), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.APX-1:1:2 (SEQ ID NO: 319), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.APX.ex2-1:1:2 (SEQ ID NO: 287). La construcción de plásmidos pMON139283 está compuesta por la secuencia codificante del péptido de tránsito, GOI-TS-APX2:1:1, presentada como SEQ ID NO: 279, que se compone además del elemento, TS-SETit.APX.2.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 285), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.APX.2-1:1:1 (SEQ ID NO: 317), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.APX2.ex2-1:1:1 (SEQ ID NO: 288). La construcción de plásmidos pMON139281 está compuesta por la secuencia codificante del péptido de tránsito, GOI-TS-CNT:1:2, presentada como SEQ ID NO: 280, que se compone además del elemento, TS-SETit.CNT.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 294), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.CNT.1-1:1:1 (SEQ ID NO: 320), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.CNT.ex2-1:1:2 (SEQ ID NO: 295). La construcción de plásmidos pMON139291 está compuesta por la secuencia codificante del péptido de tránsito, GOI-TS-DH-DPS:1:2, presentada como SEQ ID NO: 281, que se compone además del elemento, TS-SETit.DHDPS.Ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 297), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.DHDPS_1-1:1:1 (SEQ ID NO: 321), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.DHDPS.Ex2-1:1:1 (SEQ ID NO: 298). La construcción de plásmidos pMON139288 está compuesta por la secuencia codificante del péptido de tránsito, GOI-TS-Fe-SD:1:1, presentada como SEQ ID NO: 282, que se compone además del elemento, TS-SETit.Fe-SD.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 299), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.Fe-SD-1:1:1 (SEQ ID NO: 322), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.Fe-SD.ex2-1:1:1 (SEQ ID NO: 300). La construcción de plásmidos pMON139287 está compuesta por la secuencia codificante del péptido de tránsito, GOI-TS-PPR:1:1, presentada como SEQ ID NO: 283, que se compone además del elemento, TS-SETit.PPR.ex1-1:1:1 (SEQ ID NO: 305), unido operativamente en 5' al elemento intrónico, I-SETit.PPR-1:1:2 (SEQ ID NO: 323), unido operativamente en 5' al elemento, TS-SETit.PPR.ex2-1:1:2 (SEQ ID NO: 306).

Las secuencias codificantes aisladas que codifican los CTP de *S. italica* se probaron utilizando vectores de plantas diseñados para su uso en protoplastos transitorios o en ensayos de plantas de transformación estables. Los fragmentos de ADN que codifican el CTP se clonaron en marco con una secuencia de codificación de GUS utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Un vector de transformación de plantas se construyó utilizando procedimientos conocidos en la técnica y se comprende de una manera similar a los vectores de plantas descritos en los ejemplos anteriores. El casete de expresión utilizado para probar el CTP está compuesto por un promotor constitutivo como el promotor del virus del mosaico de la coliflor, P-CaMV.35S-enh-1:1:9 (SEQ ID NO: 1096), unido operativamente en 5' a un elemento líder, L-Ta.Lhcb1-1:1:1 (SEQ ID NO: 1097), unida operativamente en 5' a una secuencia de codificación para GFP en la que el CTP de prueba se fusiona en el marco en el extremo 5' de la secuencia de codificación de GFP para permitir la traducción de una molécula de CTP-GFP quimérica, unida operativamente a la región de terminación 3' de nopalina sintasa de A. *tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 1088). Para la transformación estable de la planta, un segundo casete de selección del transgén utilizado para la selección de células vegetales transformadas que confiere resistencia al herbicida glifosato (impulsado por el promotor de la actina 1 del arroz) se clonó adyacente al casete del transgén de prueba CTP. Los dos casetes del transgén están flanqueados en el límite derecho y la región del límite izquierdo de *Agrobacterium tumefaciens* para permitir la integración estable de ambos casetes transgénicos en el genoma de la célula vegetal.

Para ensayos de prueba transitorios de la CTP, las células de protoplastos se transformaron con la construcción del plásmido vegetal que comprende el casete del transgén de prueba CTP. Se observaron células de protoplastos transformados utilizando microscopía y fluorescencia para determinar la cantidad relativa de proteína GFP presente

en el cloroplasto y en el citosol. Un CTP efectivo hará que la mayoría de la fluorescencia de GFP aparezca en el estroma o tilacoide del cloroplasto, Dependiendo del tipo de CTP elegido. La proteína se aisló y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida y se tiñó usando procedimientos convencionales y se comparó con una proteína GFP no plastídica convencional dirigida para determinar si se había producido un procesamiento adecuado del péptido de tránsito. Para la transformación estable de la planta, las plantas de maíz se transformaron como se describe anteriormente utilizando procedimientos de transformación *mediados* por *Agrobacterium* conocidos en la técnica. Los tejidos se recogieron de los transformantes en desarrollo y se observaron microscópicamente con fluorescencia para determinar las cantidades relativas de proteína GFP en el cloroplasto y el citosol. La proteína se aisló y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida y se tiñó usando procedimientos convencionales y se comparó con una proteína GFP no plastídica convencional dirigida para determinar si se había producido un procesamiento adecuado del péptido de tránsito.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que comprende la SEQ ID NO: 272 o 790, en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible heteróloga y en la que la expresión de dicha molécula polinucleotídica transcribible heteróloga está impulsada por un promotor constitutivo o por un promotor de raíz potenciado.

2. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la secuencia de ADN comprende otro elemento regulador.

3. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la molécula de polinucleótido transcribible heteróloga comprende un gen de interés agronómico.

4. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la molécula polinucleotídica transcribible heteróloga comprende un gen capaz de proporcionar resistencia a herbicidas en plantas.

5. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que la molécula de polinucleótido transcribible comprende un gen capaz de proporcionar control de plagas vegetales en plantas.

6. Una célula de planta transgénica que comprende una construcción de ADN que comprende una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 272 o 790, en la que dicha secuencia está unida operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible heteróloga y en la que la expresión de dicha molécula polinucleotídica transcribible heteróloga está impulsada por un promotor constitutivo o por un promotor de raíz potenciado.

7. La célula de planta transgénica de la reivindicación 6, en la que dicha célula vegetal transgénica es una célula de una planta monocotiledónea.

8. La célula de planta transgénica de la reivindicación 6, en la que dicha célula vegetal transgénica es una célula de una planta dicotiledónea.

9. Una planta transgénica, o parte de la misma, que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1.

10. Una planta descendiente de la planta transgénica de la reivindicación 9, o una parte de la misma, en la que la planta descendiente o parte de la misma comprende dicha molécula de ADN.

11. Una semilla transgénica, en la que la semilla comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1.

```
P-SETit.Act8-1:1:5  TGTGCCATACCCGAGTGGCCATTATATAAATGTAAACTTGATTGACGAAATAATTCAGGC
P-SETit.Act8-1:1:6  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Act8-1:1:5  ACAAGCTGGAAAAATATTATTTAAATTTTTTTTCGATCAATCAGGGCATCAGGTACAAAA
P-SETit.Act8-1:1:6  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Act8-1:1:5  GCTGGACAGTGTGATCGAAAAGGCAACACCTGGAATGGGGTGTTCGTTCGGTTGGGTGAG
P-SETit.Act8-1:1:6  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Act8-1:1:5  CGCAGCAGGCCCAAAAGCCGACCCAAGCAACATCCAGCGAAGAACCAGTTGGACTTGGAC
P-SETit.Act8-1:1:6  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Act8-1:1:5  CGACCGATTGGCGGGCGCGCACGTACTGATGCTGCGGGGCCCACTAGGCAGATCGGACGG
P-SETit.Act8-1:1:6  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Act8-1:1:5  CGGGTGCGTCCTCCGCGTCGCCCATCGTGCGGTCCAGGTTGTCTCAGCATCTCCAGCTCA
P-SETit.Act8-1:1:6  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Act8-1:1:5  TTCCAGCCTCAGGCGGCTCTTTGGGGGGGCCCTCTATTTATTTTCTCTCCTTTTTTCGAC
P-SETit.Act8-1:1:6  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Act8-1:1:5  TCGCTCTCATTTTTTCTCCATTTCTTTTTCTTTGGTCCCGGACCACAGGTACTTCCAGTGG
P-SETit.Act8-1:1:6  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Act8-1:1:5  AAGGAATATAATTGTAGTTTTCTATTGTGTAAATAGCATTGTCTCTGATACACAATAGAC
P-SETit.Act8-1:1:6  ----------------------------------------ATTGTCTCTGATACACAATAGAC
                                                            **********

P-SETit.Act8-1:1:5  ATGAAATACCTTGGTGCCAGGGTTCTCACTCTTCTGGTTATGTTGTTTGATTCTTGATCC
P-SETit.Act8-1:1:6  ATGAAATACCTTGGTGCCAGGGTTCTCACTCTTCTGGTTATGTTGTTTGATTCTTGATCC
                    ************************************************************
```

FIG. 1a

```
P-SETit.Act8-1:1:5  AAACTCAAGATGCTGAACTGAAATCATAAAATTTCATCCTTTACAAATTACCCTAAAGGA
P-SETit.Act8-1:1:6  AAACTCAAGATGCTGAACTGAAATCATAAAATTTCATCCTTTACAAATTACCCTAAAGGA
                    ************************************************************

P-SETit.Act8-1:1:5  GTTGTTTTCATTTTGCCTTCAATTAAAGTTCTTCGCCTTCAACGGTGTGGTTTGTTGGAA
P-SETit.Act8-1:1:6  GTTGTTTTCATTTTGCCTTCAATTAAAGTTCTTCGCCTTCAACGGTGTGGTTTGTTGGAA
                    ************************************************************

P-SETit.Act8-1:1:5  GTTAGAAGCATTGGCTTCGTGGCATGGACCTACTTGCAAATAATTTCCTCCCAATTAAAA
P-SETit.Act8-1:1:6  GTTAGAAGCATTGGCTTCGTGGCATGGACCTACTTGCAAATAATTTCCTCCCAATTAAAA
                    ************************************************************

P-SETit.Act8-1:1:5  GTTTTTTTTTGCAAATAATGCCTCTTTTGATGCCATCGCCTTTTCTAGCCCGTGACAACC
P-SETit.Act8-1:1:6  GTTTTTTTTTGCAAATAATGCCTCTTTTGATGCCATCGCCTTTTCTAGCCCGTGACAACC
                    ************************************************************

P-SETit.Act8-1:1:5  GGAGTTCAGGAGATGCATAACTGTCTTTGAGATCCCCTTTTATTTTTATTTTGATTG
P-SETit.Act8-1:1:6  GGAGTTCAGGAGATGCATAACTGTCTTTGAGATCCCCTTTTATTTTTATTTTGATTG
                    ************************************************************

P-SETit.Act8-1:1:5  CAAACTAATTTTAGTTGGCACTAGCCAGGATGGGCTAAATAATTCTTGAGATGTTGGCCT
P-SETit.Act8-1:1:6  CAAACTAATTTTAGTTGGCACTAGCCAGGATGGGCTAAATAATTCTTGAGATGTTGGCCT
                    ************************************************************

P-SETit.Act8-1:1:5  AAATAATTTTCAGAAATGAAGTGTCCTCCACGTCTCCATGACAAAAAAAAAAATACTCCAT
P-SETit.Act8-1:1:6  AAATAATTTTCAGAAATGAAGTGTCCTCCACGTCTCCATGACAAAAAAAAAAATACTCCAT
                    ************************************************************

P-SETit.Act8-1:1:5  GTTGGACTACAGTCTAAAAAAAAGAACAGAGCTGTAACATGATGATTAAAAAAAAAGAAGAA
P-SETit.Act8-1:1:6  GTTGGACTACAGTCTAAAAAAAAGAACAGAGCTGTAACATGATGATTAAAAAAAAAGAAGAA
                    ************************************************************

P-SETit.Act8-1:1:5  CATTTGAGACCTCTGTTTCATGCTGAAATTATACCTTGTTTTTTTTCCATTCTTGTTACCG
P-SETit.Act8-1:1:6  CATTTGAGACCTCTGTTTCATGCTGAAATTATACCTTGTTTTTTTTCCATTCTTGTTACCG
                    ************************************************************
```

FIG. 1b

```
P-SETit.Act8-1:1:5  TGGTCAAAAGGAAATGTTAGATACTAACTGATAACTGAAAAATAGATGCATATCCTTAAA
P-SETit.Act8-1:1:6  TGGTCAAAAGGAAATGTTAGATACTAACTGATAACTGAAAAATAGATGCATATCCTTAAA
                    ************************************************************
P-SETit.Act8-1:1:5  AAAGATCTCCATTTGGAAAAAATATGATAAACACGAAATTCGTAGACGCCGAACATCTGA
P-SETit.Act8-1:1:6  AAAGATCTCCATTTGGAAAAAATATGATAAACACGAAATTCGTAGACGCCGAACATCTGA
                    ************************************************************
P-SETit.Act8-1:1:5  AATATTATTCAATTTTTTGGGGGAAAAAAATACACGCCTCGTATTTCAAACCGTATCTGT
P-SETit.Act8-1:1:6  AATATTATTCAATTTTTTGGGGGAAAAAAATACACGCCTCGTATTTCAAACCGTATCTGT
                    ************************************************************
P-SETit.Act8-1:1:5  GTCACGGACCACGCATCAATCGAGTCCACGTACCACCCATCCCTTCCCCTCCCCTTCCCCC
P-SETit.Act8-1:1:6  GTCACGGACCACGCATCAATCGAGTCCACGTACCACCCATCCCTTCCCCTCCCCTTCCCCC
                    ************************************************************
P-SETit.Act8-1:1:5  CCCGCTCTTGTATAAACTCCACCCCCAGTCCTCGGGG
P-SETit.Act8-1:1:6  CCCGCTCTTGTATAAACTCCACCCCCAGTCCTCGGGG
                    ***********************************
```

FIG. 1c

```
P-SETit.Alc1-1:1:1  CAATCATTGCCACTGAAATCCCTGAGTATAACATAGTTCTCACGAAGAAGGCCAAAGTTG
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1  AGCCCAAAATTTTTCGATAAAGTCGTTACATCTTATTTCGTACTTATATCATCTTTACAC
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1  ACATGATCAATATTTTTTTCTAGCAAAAAGTCATGCATGCTTCCATATACAGTGAAGATA
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1  TGGGCATGGATAAATCCTAGGAACGCAAAAAAAAAAATTGACCTTGCTATGGCCCACGACT
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1  TCTTGATTCTACCAATTTGACGCATGAAACCTCTCTCAAGAATGGACATAAATTTTTGGC
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1  AAAAAAGGTTCAACCCAAGTATATAACATAACACACGTATCACAATAGTCTACGTTGCTA
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1  GCATGATGGGGAACAATACATGCTCATAAACCAAACATCATTGTTTAAAATTTTTTGGTT
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1  ACATGTTTGATTCACATGTTGCCGTAAAATGGTGCTGATGAGCTTAGACGAAGGACTCAT
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1  TGCGCTTCCTGTTATCTTGTGCAAACATCTCAAAAGTCATTATTCAAATTCATAAAGTGA
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1  ACGATACAACACTTTTAACCGGCGTAAATAGTTTAATAGAGGTAGCGTATAGGGTCGGAAT
P-SETit.Alc1-1:1:2  ----------------------------------------------------------
```

FIG. 2a

```
P-SETit.Alc1-1:1:1      ATCATCTTCTTTGTAGCCATAGGCATGTCGCACCCAAGAATTGAATGGAAATATGATACC
P-SETit.Alc1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1      GTTAAGTTGAGCGCCAGTGTCTCATGTTGTTGTGCACCGATGAAATTGGTTCCTGAGTAT
P-SETit.Alc1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1      ATATGGAAAACAAAAGAGTCTAGGTTTTAATCCGATCCATTGTTACCACACATCCAGAAA
P-SETit.Alc1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1      CACTATCTTCAACTTTTCATAGAAATATTATGCAAAAGCAGGAAGAAAAACTTCCTATGG
P-SETit.Alc1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1      ATCGATATAGATGGCCCTACAATATGTATCTGTAGACAAGGTAGAATACATTCAAATATG
P-SETit.Alc1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1      TCAAAAGTAGAATCTTGGGAAACTACAATGTGCACAAGCAGCGGTCCTCCCACTTTGAGC
P-SETit.Alc1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1      GACTTTCACCTTTAGAGAGATAGCTCTAACATATGCATGCGTAGATCTGGTGCAATATAT
P-SETit.Alc1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1      CCACACCGATTGCAAACGGATTCCACGCAACCACAACGCAAACACCTTGTTTGCGTGACT
P-SETit.Alc1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1      TACAATACTGACTTAATCTAGGTTCTTGTGTATTGGCTCATTACTTACTTGATAACTTCT
P-SETit.Alc1-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Alc1-1:1:1      TCTAGAACTAGTGCGTTACCTCTATCATCCATGAGGATTGGCTCATGGAACAAATCCTAT
P-SETit.Alc1-1:1:2      -------------------------CATCCATGAGGATTGGCTCATGGAACAAATCCTAT
                                                 **********************************
```

FIG. 2b

```
P-SETit.Alc1-1:1:1  CCGAGTCAGATGAACAATGAAGCTCAAAATGATTTGGATCCACATCAGCAAATCACAGCT
P-SETit.Alc1-1:1:2  CCGAGTCAGATGAACAATGAAGCTCAAAATGATTTGGATCCACATCAGCAAATCACAGCT
                    **********************************************************

P-SETit.Alc1-1:1:1  TTACAAACCAACTTTAACAAAGTGGAACACATATTTTTGTGGCTAAGACTTTCACGTGTT
P-SETit.Alc1-1:1:2  TTACAAACCAACTTTAACAAAGTGGAACACATATTTTTGTGGCTAAGACTTTCACGTGTT
                    **********************************************************

P-SETit.Alc1-1:1:1  TAAAGGTGAACCGACCATGATGTTGTCACAAAGACAATACCAACAGAAGAAGACACTTTT
P-SETit.Alc1-1:1:2  TAAAGGTGAACCGACCATGATGTTGTCACAAAGACAATACCAACAGAAGAAGACACTTTT
                    **********************************************************

P-SETit.Alc1-1:1:1  TTGCTTGTACAACGGCAAGTTGTCTTGCCAACACATACATTACAACACACAAGGGTATTTAT
P-SETit.Alc1-1:1:2  TTGCTTGTACAACGGCAAGTTGTCTTGCCAACACATACATTACAACACACAAGGGTATTTAT
                    **********************************************************

P-SETit.Alc1-1:1:1  CACTAAAATGCCAAAATTGACTAGATACCATGTCATCTCCAGTTTATCAAGCTAGCGATTT
P-SETit.Alc1-1:1:2  CACTAAATGCCAAAATTGACTAGATACCATGTCATCTCCAGTTTATCAAGCTAGCGATTT
                    **********************************************************

P-SETit.Alc1-1:1:1  GCAAGGCACAAGCAAAAATCTTGCTAAAGCTACATGAGCTCTCATGCCTATAAATACGCC
P-SETit.Alc1-1:1:2  GCAAGGCACAAGCAAAAATCTTGCTAAAGCTACATGAGCTCTCATGCCTATAAATACGCC
                    **********************************************************

P-SETit.Alc1-1:1:1  CCAAATGTTGTGTAGGT
P-SETit.Alc1-1:1:2  CCAAATGTTGTGTAGGT
                    *****************
```

FIG. 2c

```
P-SETit.Cys1:1:2      GGTGGGTTAATCTTTATGGGTAGTTTAGTGTTGGCTTGCAACTTTATCATGAAAATAGGT
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      TGTATAGTCACTTGTTGGCTTGCAACTTTATCATGAAGGAAAGTTGTATAGTCATGTGTT
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      CAAAAGTTTGCATCTCTAACCCCTGCATGTACTAAATCGTAGACACTGAAGCTCCAAAAG
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      TGGAATTCTTGGATTTCTCTGAAGAACCTTCGGAGTTTGAGGAGATTTTTGAGTTGATCC
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      CCTGTGAAGCCGGACCTTCGGACAACACTAACCTTTTTACAGATCAAGGCAAGCCCCGGT
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      GCATCTATACCTACCTACTTTGGAGTTATTATTTCATGTGTTCAATTGTTGGTTATTTTC
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      CGTATGAATGCATTAAGTCTAGGAGTTGATTGAAACCTATTCTTGTGCATGATCCTACCT
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      GATTTAGAGGACATCTTTGCCACTTGTTCACTAATTAGTAACTATCCTATGCTTAGCAAT
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      GCTTAGATACTTCAAGCAACTTGGATTGCTTAGCTCTAAGGAAAATTTTGGTCATACATG
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      TTAGTTAAGGAAAAATAGCCTGGAAATTGGAAATGCAGACAGAAGCTAGAGATGGTAGTT
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys1:1:2      CTGTTTGCTAAGTTAATTTGGTTAAGGCCCGATCGTTGTCTTAACCTTTGATCAAGTGAG
P-SETit.Cys1:1:3      ------------------------------------------------------------
```

FIG. 3a

```
P-SETit.Cys-1:1:2  TTCTACCTGGTTGCTTACTGGGTATGGGACCAGTAAAGCCCGGTAGGTTAGTTGGCTCTT
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys-1:1:2  TGATCGGGAAATATTTCGTACCCGTGCTTGACGTGCTGGAGAATGGTAGGGGCATAGCCTG
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys-1:1:2  AAACTCACATGGAGATCAGGCCAGACGTGGGGTCCCATGTGGGGTGCGTCCCTGGGTTCG
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys-1:1:2  GGTAGTCATGTTCCCAATTTTTGGGTACGGCTAATAGAAAGGTCATTATATGCAACCTAG
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys-1:1:2  ACAGTTGTACATAGCTGGTGGTTGGGTATCTCCTGCAGGATGTAAATTGATCCGGATCGC
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys-1:1:2  CGCAATTCTCGGATATGAATGCACTTGATCACCGTTAAGCATCATACTGTAATCCAGTTG
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys-1:1:2  AATATAATGTTTTTCCTAGAATGAATATGCTGTATGACTTAGTTCCACTGAGTGCTCAAA
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys-1:1:2  ATGTTTTATTCATCTAGACTGGTTAGGTAACAACTAAACAAAAATAAAGAATAAAGTTA
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys-1:1:2  AGGTTCCACTTATAGTAAGCCTTTCCGCAAAAATGTGAGTCCGCCAGTATACTAAACAGC
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Cys-1:1:2  TATCATTCAGTTTTTGGAAAAAAAAAACTATCTATATTGGTTAATCGGGTCAGTCTTGCT
P-SETit.Cys-1:1:3  ------------------------------------------------------GCT
                                                                      ***

P-SETit.Cys-1:1:2  AAGTACCCTCGGACTCAGGGGAATCCTTCGTTGCTATTTCAGAACTACAGCAAGAGTCCG
P-SETit.Cys-1:1:3  AAGTACCCTCGGACTCAGGGGAATCCTTCGTTGCTATTTCAGAACTACAGCAAGAGTCCG
                   ************************************************************
```

FIG. 3b

```
P-SETit.Cys-1:1:2  CCGAGGGAGAAGCCCCGAAGAATTAGGGTATTTTTACGAGTCTCATAATACCCTAGAAAT
P-SETit.Cys-1:1:3  CCGAGGGAGAAGCCCCGAAGAATTAGGGTATTTTTACGAGTCTCATAATACCCTAGAAAT
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  AAAACTCAGATGTTTAACTTTCACCTGGACTAGTTTATGTTTTAAACTCTTAGAACTGTT
P-SETit.Cys-1:1:3  AAAACTCAGATGTTTAACTTTCACCTGGACTAGTTTATGTTTTAAACTCTTAGAACTGTT
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  CTGACCTGCATTGTTAAGTTTGTTTCAAATTATGGTTGTAATAATTCGCACCTCGATATG
P-SETit.Cys-1:1:3  CTGACCTGCATTGTTAAGTTTGTTTCAAATTATGGTTGTAATAATTCGCACCTCGATATG
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  TATGTAAAAAATGTAATATTTGTTGATACCTTCCCATCGTGGAAGTGATCCTGATGTATGG
P-SETit.Cys-1:1:3  TATGTAAAAATGTAATATTTGTTGATACCTTCCCATCGTGGAAGTGATCCTGATGTATGG
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  CTATGGATCACGTCGTGGATGTTTCGAGGAGTCCTAAGGACACTCGACGGAATACCGGAC
P-SETit.Cys-1:1:3  CTATGGATCACGTCGTGGATGTTTCGAGGAGTCCTAAGGACACTCGACGGAATACCGGAC
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  TTAGACTGTTTTAAGTGCGTTTCGGATAATTGTTGTTCTGATAGCGATTAGACGCGCTTA
P-SETit.Cys-1:1:3  TTAGACTGTTTTAAGTGCGTTTCGGATAATTGTTGTTCTGATAGCGATTAGACGCGCTTA
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  AACCAGTTTAAGTTGGGCGGTTCCGCCACACTATCCCTTATTACTGATTTTGGTTTGGTT
P-SETit.Cys-1:1:3  AACCAGTTTAAGTTGGGCGGTTCCGCCACACTATCCCTTATTACTGATTTTGGTTTGGTT
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  TGGGTCCATCCGAGATGAAGAGAGGCAAGCACATGTACTGGAATAATATTCCTGGATCG
P-SETit.Cys-1:1:3  TGGGTCCATCCGAGATGAAGAGAGGCAAGCACATGTACTGGAATAATATTCCTGGATCG
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  AAGGTATGAGCATCACACATTTAAATGCTAGTATTAAGAAGAGGCAAGCACATGTACTGG
P-SETit.Cys-1:1:3  AAGGTATGAGCATCACACATTTAAATGCTAGTATTAAGAAGAGGCAAGCACATGTACTGG
                   **********************************************************
```

FIG. 3c

```
P-SETit.Cys-1:1:2      AATAATATCCGAGATGCAAGTTTACAACAATAACTCTGGCATTGCATCACCTGCTCAACC
P-SETit.Cys-1:1:3      AATAATATCCGAGATGCAAGTTTACAACAATAACTCTGGCATTGCATCACCTGCTCAACC
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      CATGTCCAATCACATGATAATCCTACCAAACTTAGCACGAGCTGAATTAAAATTTTCCTT
P-SETit.Cys-1:1:3      CATGTCCAATCACATGATAATCCTACCAAACTTAGCACGAGCTGAATTAAAATTTTCCTT
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      AATCCGTTTTATATATGTACAAATGCCACCATTGCCACATAAATGCATAAGTTCTTCCCA
P-SETit.Cys-1:1:3      AATCCGTTTTATATATGTACAAATGCCACCATTGCCACATAAATGCATAAGTTCTTCCCA
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      GATAATTCTATAGGCCACCATTGCTATTTTATAAGAATCCTTCAGAATTTTAAGCTGAAA
P-SETit.Cys-1:1:3      GATAATTCTATAGGCCACCATTGCTATTTTATAAGAATCCTTCAGAATTTTAAGCTGAAA
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      GGAACTTGACTAAAGGAGGAACAACAAGGATAGAGTCTAGTGCTCCATCCCATGCTACAG
P-SETit.Cys-1:1:3      GGAACTTGACTAAAGGAGGAACAACAAGGATAGAGTCTAGTGCTCCATCCCATGCTACAG
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      ATTTTAGTTCAGTTTTCAACCAACAAGAATTAAAATTTATTTTCTAGCAAATGAAAATTC
P-SETit.Cys-1:1:3      ATTTTAGTTCAGTTTTCAACCAACAAGAATTAAAATTTATTTTCTAGCAAATGAAAATTC
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      AAGGGTCATTTTCTTAAGGTTTGAAGTTATACCATTTTGCATATATATCATAAGTATACA
P-SETit.Cys-1:1:3      AAGGGTCATTTTCTTAAGGTTTGAAGTTATACCATTTTGCATATATATCATAAGTATACA
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      AACTTTAGCCATATAATTTTTGCTGGCCACACCTTGGCTACTTTATAAAGACCCTGCACA
P-SETit.Cys-1:1:3      AACTTTAGCCATATAATTTTTGCTGGCCACACCTTGGCTACTTTATAAAGACCCTGCACA
                       ************************************************************
```

FIG. 3d

```
P-SETit.Cys-1:1:2  ATTTTAAGATAAAAGAAATTCGGCAAATTAAAGGGAGAAACAACAAGGAACGAGTCAGGT
P-SETit.Cys-1:1:3  ATTTTAAGATAAAAGAAATTCGGCAAATTAAAGGGAGAAACAACAAGGAACGAGTCAGGT
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  GCCCCATCCCATGTTTCCATCGAGATGAAGAAGGGGCAAAGCACATGTACTTGAATATAT
P-SETit.Cys-1:1:3  GCCCCATCCCATGTTTCCATCGAGATGAAGAAGGGGCAAAGCACATGTACTTGAATATAT
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  TGGATCGAAGGTATTATCAGCATCAAATATTTGAATACGAGTAGTATTAATAACTTTGAG
P-SETit.Cys-1:1:3  TGGATCGAAGGTATTATCAGCATCAAATATTTGAATACGAGTAGTATTAATAACTTTGAG
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  CAGCGCGGAAGGTTCTTATGGCCTCAGTGATAGCTAATCTAACTTTACAATATCTCTGAC
P-SETit.Cys-1:1:3  CAGCGCGGAAGGTTCTTATGGCCTCAGTGATAGCTAATCTAACTTTACAATATCTCTGAC
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  ATTGCATCACATGCTCATCCCATGTCACATGATAATAATCCTACCAAGCTCAGCACGAGC
P-SETit.Cys-1:1:3  ATTGCATCACATGCTCATCCCATGTCACATGATAATAATCCTACCAAGCTCAGCACGAGC
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  CACATGAAATTTCTTAATCCTTTTTTTATATATATAAATGCAAAAGATTGGATCAGAG
P-SETit.Cys-1:1:3  CACATGAAATTTCTTAATCCTTTTTTTATATATATAAATGCAAAAGATTGGATCAGAG
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  CAAGTAGCTAAGTATCCTGCATCCCTCTTCATGTCCATGAATCATATCCCCGATGAACCA
P-SETit.Cys-1:1:3  CAAGTAGCTAAGTATCCTGCATCCCTCTTCATGTCCATGAATCATATCCCCGATGAACCA
                   **********************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2  CATAACCTCCCTTTTATTCTTTCAAAACAAGTTAAAAAATTTTGTTCTAGAAAATGAATTT
P-SETit.Cys-1:1:3  CATAACCTCCCTTTTATTCTTTCAAAACAAGTTAAAAAATTTTGTTCTAGAAAATGAATTT
                   **********************************************************
```

FIG. 3e

```
P-SETit.Cys-1:1:2      TTAACTCTGGTTTTCTTAAGGTTTGATTTTTTTGCGTCTATATATAAGTTCTTTACAGAT
P-SETit.Cys-1:1:3      TTAACTCTGGTTTTCTTAAGGTTTGATTTTTTTGCGTCTATATATAAGTTCTTTACAGAT
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      AACTGTACCTTTGCTAGTTTATATGAATCCTGCAGAGTTTCAAGGTGAAATTTAAGGAAC
P-SETit.Cys-1:1:3      AACTGTACCTTTGCTAGTTTATATGAATCCTGCAGAGTTTCAAGGTGAAATTTAAGGAAC
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      TTGGAAGTGGGAGAAACTGAGGATCGAGTCCAGTGCTTTATCGGTTTATCATCCCATACT
P-SETit.Cys-1:1:3      TTGGAAGTGGGAGAAACTGAGGATCGAGTCCAGTGCTTTATCGGTTTATCATCCCATACT
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      AATGATTTCTTTTTGTTCAGTTGCATGTTGCAACCGGGATGACGAATCGAATATGCAAAT
P-SETit.Cys-1:1:3      AATGATTTCTTTTTGTTCAGTTGCATGTTGCAACCGGGATGACGAATCGAATATGCAAAT
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      CACATGTACAGGGTTTACTGGCATCTTTTTTGGATCGAAGGTACGAGCACCGCATTTGAA
P-SETit.Cys-1:1:3      CACATGTACAGGGTTTACTGGCATCTTTTTTGGATCGAAGGTACGAGCACCGCATTTGAA
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      TATGAGCACTGACGTTAAGCTTCGTTAGTGGGTGAGGTTTTGCACTGTGTAAATTTCTCT
P-SETit.Cys-1:1:3      TATGAGCACTGACGTTAAGCTTCGTTAGTGGGTGAGGTTTTGCACTGTGTAAATTTCTCT
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      ACTCGTGATTCCAGTGATCTGCATAATGTCAACGGCCGTATAGGAGCAACTACTATTTAA
P-SETit.Cys-1:1:3      ACTCGTGATTCCAGTGATCTGCATAATGTCAACGGCCGTATAGGAGCAACTACTATTTAA
                       ************************************************************

P-SETit.Cys-1:1:2      GCATCCATTCGCCCATCTATTTCGATCAACGCTCACT
P-SETit.Cys-1:1:3      GCATCCATTCGCCCATCTATTTCGATCAACGCTCACT
                       ************************************
```

FIG. 3f

```
P-SETit.Dzs-1:1:4      TTTTGGGACGCGAGCAGCTTTAGAGCTGGGATGACGGCCTCTCTTCGTGTGCTCGAGGCG
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      TTGCGTCACCCTAGGTTTTCCCTAGGCCAGAGGTAAGATAGTTTTGCCTGCGGCAACGCC
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      TTTAGTATTGGAAACCTTGGCTGCTTTCTTCAAGGCTTTCTGCTCCAAATGAAGAATATT
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      TTTCTTCGATGCCTCGCGAACGGGGGCCTCGACGCTGAAGAAGGAAAAGACACGATTCCC
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CCAGGATCCACCCAGCCTCCTTTGAACCTCTTTGTACTCCGAAGGAGATTCGGCACCAAG
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      AATAAAATCACCACGATCTTTAACCTTAATGGAATTGATCTCTACAAAATGAAGCGCAGG
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      AAAAGTTATGTAACGAAGAGAAAGCATGAAGAAAAATCAATACAGAGGAGGACAAGCGTA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      GAGTCTTAATTTCTTTGGTAAACTTGAAACATTTCGACCAATCCGGGCAAGGGATAGGCC
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CTTTGGTATCAGTCCAGTCGGAGTCCAGAATTGCCCAGCTACAGCGGACAGGCCACACTC
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CAAGCATGCGGTACTCCTCGATAATATCGCAAGTGCTATACTTGCAGGCAAAGAGACGAA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      GCATCGAGATGAAGGCATCACCCTCGGCACATGCGGGAGGGTCAATCTTGTAATCATCAT
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------
```

FIG. 4a

```
P-SETit.Dzs-1:1:4      GAAGAGCCTCCATCTTTTTAGTGACGAGGCAGTTGGGCTCACCAGTCTCTTCAGGCTCCA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CTTCATGATAGAGCTAGTGTTGATGCCAATCGATAGGCCACTTGTTGCGATATGCAGCCA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CGGGGTTCAAGACTCCAGTGCGTTACATGAAGTTGAGACATCCAAACTGAGCTTGTTTCC
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CGACCACTCCATTAGCACTTCTCTCCAACAAGTACTTCAGCTGGTGATGCACCTTGTGAG
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CATTAGTGAAACTGACTGCCGAGGACTTGATTTTTGTTGTTTTGCAAATCCACATATACG
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      TCGAAAGATGAACGAGAGCGTTGGGTGTCAACTGATGCAGGTAGATATCATACAGACGGA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      GTATATCTATAACAATTGGGTCCAACTCAAAACGAAGACCAACATAAAGGAGATCACGGA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      AGATGACGACCTTGTTGTCTTCGGGTTTCGGAATAACCTCAGAATTGGGTGCACGGCTAG
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CAAAGACCATCTTGTTCTGCTTCAGTAAGTCGATGTCATTGGGATGAAGCAAGCTTCAGC
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CAAAAACAACAGTCTTTGGCATAATCTGATCACCATCGTCACCCGAAGGGCGGTTGCATT
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      TTGGGGCCATTGAATACAATGAAGAACACAATTAAGCAACCAAAATGAAGTCGTCGGAAG
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------
```

FIG. 4b

```
P-SETit.Dzs-1:1:4      AATACCAAACCCAGTGAAGGGGGCTTTAGACCTCCATCAAAGAAAGCGATAGCGGTAAAA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      GTAAATGGCACGAGCCCACACAGGGTTATTTATAGGTAGAGCGAAAGAGAAACAGTAACA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      AGGGTCAAAAGTCAAAAAACCATTAAAAAAATTTAATGAAGGATTTCGAATAAGGAAAAA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      TATATTAATCAAAGGGCAAGGAAGCAAAATCATGCATGGGCCGATCTTGGGGAGTTCCGA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      AGGATGGTTGCACCATGTGTTTTAGGATCGTAAGTTCAGCCCATCAGAGGAGAAGATGGC
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CCTCGCTCACGAGGGGCTACTATTGGGGAAACCACCTTGGGAATCTCCTTCGAAGGGAGA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      AGTCCTTTTGACACTAACCATGACAGCTAGTTTGCTTTGTGGCGAGCTCTAAGTGCAGGG
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      AAGAAGAAGGCGGTACGAAGAGCTCTTAGGCGTATGAGGGCTCCTTCGGAACAAAACAAT
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      GGCTGACTGGCCCGCGGGTCTTTTGGGAGGGCCGGCATCTGACTCGTCCCCTCCAAGGTT
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      TGTCCTCAGAGGAAAGGCATGGAGTGGCTCAGCAAAGAGCACCTCGACTTCCGAAGATGA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      ACATGCGTTGAAAGACCATGCTGTCCACCACATGGATTGAAAGGACCGTACGAGGAGCTA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------
```

FIG. 4c

```
P-SETit.Dzs-1:1:4      GCTGGAGGAGTCCATACAAAAGATTTGCACTTGAAGAAACCCAATCTGTAGATCATAAAG
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      CCAACGTCCTTGGAAAAAACCGAGAAATGATACATGGCCTCATAGAGGTGAATAATTCGA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      AATCACTATCAATTCCTCCAAGACATGATTGCAGAATGAGGCTAACAGAATCCACATTGA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      GAGGGATGGAGGATCGCCCAAAAGAAGCCACCAAGAAAAACTCATTGGAAGAGAAGGCGT
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      GTGAGCAACTGACTGGCAAAGAGAAACTGGATTGGATCATGCATTGGATCTCCAAACCTA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      GACCAAAGTCCAGATCAGAGAGGCCACCCATGGTATGGTAGCCTAGAGGAAGGATCACCA
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      TGATCGCCGAGGAATGGAGAGCACGACACCGGGGAGGAGGGGGACATCGCCAGTCACCAT
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      ACTCGCATTCTTTTAGCGTCTGCTCATCTCCACCTACCCTCCCCTAGTCCCCTATCTAGT
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Dzs-1:1:4      TGCAGTGCCCACCACTAGATGGTGCCACCACGCTAACCTAAACGTCAAGTCTCTCCTTCC
P-SETit.Dzs-1:1:5      ------------------------------------AAACGTCAAGTCTCTCCTTCC
                                                           **********************
P-SETit.Dzs-1:1:4      CCGGCACCGCCCCCTATCTAGTTGCAATGCCCACCACTAGATGGTGCCACCACGCTAACC
P-SETit.Dzs-1:1:5      CCGGCACCGCCCCCTATCTAGTTGCAATGCCCACCACTAGATGGTGCCACCACGCTAACC
                       ************************************************************
```

FIG. 4d

```
P-SETit.Dzs-1:1:4      TAAACGTCAAGTCTCTCCTGCCCCAGCACCGCCCATCAGCAATCGTTGCCTGCCCACAAG
P-SETit.Dzs-1:1:5      TAAACGTCAAGTCTCTCCTTCCCCAGCACCGCCCATCAGCAATCGTTGCCTGCCCACAAG
                       ******************* ****************************************

P-SETit.Dzs-1:1:4      CACGACACGATGGCACTTATGGAATCCTCTTAATACCAACACTACTCCAATCCAAAAATT
P-SETit.Dzs-1:1:5      CACGACACGATGGCACTTATGGAATCCTCTTAATACCAACACTACTCCAATCCAAAAATT
                       ************************************************************

P-SETit.Dzs-1:1:4      TAACATTGCAGTTTGATTTTGCTCTCGACCTAAAGAATCACAAAAATTAATTTAGGTGTC
P-SETit.Dzs-1:1:5      TAACATTGCAGTTTGATTTTGCTCTCGACCTAAAGAATCAC-AAAATTAATTTAGGTGTC
                       ************************************** *******************

P-SETit.Dzs-1:1:4      TGGAATCTATGAAGTGCGAGAGAGTAATTAATAAATCATGTATATATGTCCAGTTGTTGT
P-SETit.Dzs-1:1:5      TGGAATCTATGAAGTGCGAGAGAGTAATTAATAAATCATGTATATATGTCCAGTTGTTGT
                       ************************************************************

P-SETit.Dzs-1:1:4      TTGGGGAAACCTGTCTCTGTGCAAAAGCAGGGTCCTTTGCCCATGTACTTTTACTATCAG
P-SETit.Dzs-1:1:5      TTGGGGAAACCTGTCTCTGTGCAAAAGCAGGGTCCTTTGCCCATGTACTTTTACTATCAG
                       ************************************************************

P-SETit.Dzs-1:1:4      TCAACAAGGCAGCATTCTCTCATAAAACCACGAAAGTAAAGGAACCAAGACCATCACAGA
P-SETit.Dzs-1:1:5      TCAACAAGGCAGCATTCTCTCATAAAACCACGAAAGTAAAGGAACCAAGACCATCACAGA
                       ************************************************************

P-SETit.Dzs-1:1:4      CTCCGTGCATGAGTTATGACATGTAAAGGAAATCAGCCCTGGACAAATTCAATTGCAGAA
P-SETit.Dzs-1:1:5      CTCCGTGCATGAGTTATGACATGTAAAGGAAATCAGCCCTGGACAAATTCAATTGCAGAA
                       ************************************************************

P-SETit.Dzs-1:1:4      GTCCACAGAAGACTCCATGTGTGAGTAATGACATGTAAAGCCAAATCAGCCTGGACAAAT
P-SETit.Dzs-1:1:5      GTCCACAGAAGACTCCATGTGTGAGTAATGACATGTAAAGCCAAATCAGCCTGGACAAAT
                       ************************************************************

P-SETit.Dzs-1:1:4      TCCGTTGCAGAAGACCACAGTAGACTCCATGTATGAGTTAAGAGTATATGACATGTAGAG
P-SETit.Dzs-1:1:5      TCCGTTGCAGAAGACCACAGTAGACTCCATGTATGAGTTAAGAGTATATGACATGTAGAG
                       ************************************************************

P-SETit.Dzs-1:1:4      CATATCAGCGCCTGGACAAATTCCCTTGCAGAAGTTTCTCGATCCACCTCAGCTAGTCAC
P-SETit.Dzs-1:1:5      CATATCAGCGCCTGGACAAATTCCCTTGCAGAAGTTTCTCGATCCACCTCAGCTAGTCAC
                       ************************************************************

P-SETit.Dzs-1:1:4      GATGCAATCACCTTACTTTAGCAAAAGCAAAACAAACTGAGATATGCAGTCACATCCTTA
P-SETit.Dzs-1:1:5      GATGCAATCACCTTACTTTAGCAAAAGCAAAACAAACTGAGATATGCAGTCACATCCTTA
                       ************************************************************
```

FIG. 4e

```
P-SETit.Dzs-1:1:4   ATAAACTCGTCATACTACCCTCACCCTATTATCAAAAGTAAGAACAACACAAATACTTTTC
P-SETit.Dzs-1:1:5   ATAAACTCGTCATACTACCCTCACCCTATTATCAAAAGTAAGAACAACACAAATACTTTTC
                    **********************************************************
P-SETit.Dzs-1:1:4   CCATGTACCCCCATGCTGAATATCATGGAGGCGATCATGTGGGTCCAAAAACAGTTAGGGA
P-SETit.Dzs-1:1:5   CCATGTACCCCATGCTGAATATCATGGAGGCGATCATGTGGGTCCAAAAACAGTTAGGGA
                    **********************************************************
P-SETit.Dzs-1:1:4   AATCTCCAAATTTGACTAGATGCCATGTCACCTCCAGCTTATCTACCCTCCAACTTTCAG
P-SETit.Dzs-1:1:5   AATCTCCAAATTTGACTAGATGCCATGTCACCTCCAGCTTATCTACCCTCCAACTTTCAG
                    **********************************************************
P-SETit.Dzs-1:1:4   TTCTGCAAATGACAAAAACCTTATTGATCTGCACGGTGTTTGTAGCATATAAGCACTATA
P-SETit.Dzs-1:1:5   TTCTGCAAATGACAAAAACCTTATTGATCTGCACGGTGTTTGTAGCATATAAGCACTATA
                    **********************************************************
P-SETit.Dzs-1:1:4   AATAGGACCTAGATGAATGCTCAGCCCA
P-SETit.Dzs-1:1:5   AATAGGACCTAGATGAATGCTCAGCCCA
                    ****************************
```

FIG. 4f

```
P-SETit.Gst-1:1:1      GGATGATGGATTGCTTTTGAGAATGACTTCTTAAAGCGTCAAGCTTTTCTGACTGTGTCA
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      GGTCAGCTTCAGGTTGAAACTTATGCTTGTGCTCTCAGTAGTGTATATACCTTTGGACCA
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      ACGTTCCGGGCAGAGAACTCACATACATCAAGACATCTGGCAGAGTTTTGGATGGTTGAA
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      CCAGAAAATGCATTTGCAAACTTGCAGGTGAGCTGCTTCTTGATGACTAACTTTATTACT
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      TTGTGGTTCGCCACCTATCAAATTGGATCATGGGGTTTTGTGTGGACATAACTAATGTTA
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      AACTTGTATAAATTGTGTCACAGGATGATATGAACTGTGCAGAAAAATATGTACAATACC
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      TCTGCCAGTGGTTACTCGATCATTGTGAAGAAGACATAGATTTCATTAGCAAAAAATACG
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      AGAGAAACAGTAGACATAATCAAACTGCAATTGACCGTCTGAAGCTTGTTTCCTCAACGC
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      ATTTTGAACGTATTTCATACACAATGGCTGTGGACATTCTGAAAAATACAGAACAAGGTT
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      GAATGGGGAATCGATTTAGCATCTGAGCATGAAAGGTATGTGCAAGTTGTCAGTTGATCT
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      TACTGGTCTTCACCTGATTTACCTTCTTTGATTGGTTAACTGTAACTACGTATTCTGTGA
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------
```

FIG. 5a

```
P-SETit.Gst-1:1:1      AGGTATTTGACTGAGGTGATATATAAGAAGCCAGTTATTGTTTATAACTATCCCAAAGAA
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      ATAAAAGCATTTTATATGAGGCTCAATGATGATCAGAAGACTGTTTCTGCTATGGATGTT
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      CTTGCGCCACAGGTATAGATCGAATTGTTGAAATGTCTATGATGCTGTCCATTGTTCACT
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      GAAGTGCCCCACACCATTCTACCCTCAATCAGCATGGATATAAGCAGCCAGATTCATGTC
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      TGCTCTTAGTAGAATATAACTATTTCTTTCTGCCTTTTAGAATTTAGATATCTCTGGATT
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      CTTTTTTCGCCTTTTCACCAATTACAAAGAACTAAAACTGCATATAACTATATTAAGATA
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      ACAATATTTACATTTTCTGAAATAGCTGTATGCTTGCAACTACATGCTGGATATTTTGCT
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------


P-SETit.Gst-1:1:1      TTGCCTGCTTTGTATATAGTTTGAAAGTGAGCTTTGTGGCCGATGATTTCTACCTAACCA
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      TAAATTATTTTCCTTGGTAGGTTGGTGAATTGACTGGTGGAAGCCAGAGGAGCATCTAGA
P-SETit.Gst-1:1:2      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Gst-1:1:1      TGTCCTGAAACAGAGGTACCGACTTGCTCAATATAATTTTGTTTCTATCAGGATCAATAT
P-SETit.Gst-1:1:2      -------------------------------------------CAGGAT-----T
                                                                  ******     *
```

FIG. 5b

```
P-SETit.Gst-1:1:1      TAGGTTTCATTTGCTCGTCGGTGGAGGTAGCAAGCAGTTTTGTCCATCATTGGTTCACGA
P-SETit.Gst-1:1:2      TAGGTTTCATTTGCTCGTCGGTGGAGGTAGCAAGCAGTTTTGTCCATCATTGGTTCACGA
                       ************************************************************

P-SETit.Gst-1:1:1      ATATTTGCTGAACATTGTCCAATATTTGTTCTACAGAATTTTGGATGCGGGATTGCCCAT
P-SETit.Gst-1:1:2      ATATTTGCTGAACATTGTCCAATATTTGTTCTACAGAATTTTGGATGCGGGATTGCCCAT
                       ************************************************************

P-SETit.Gst-1:1:1      CACCCCTGATGCGAGCTAGTCTGCTTCATGGCGAGGCGGTGACCTCGACGTGCAGGGTGC
P-SETit.Gst-1:1:2      CACCCCTGATGCGAGCTAGTCTGCTTCATGGCGAGGCGGTGACCTCGACGTGCAGGGTGC
                       ************************************************************

P-SETit.Gst-1:1:1      CAGGGTAGAGTGCCCATCACCCCTGACGCGAGCTAGTCTGCTTACGCAAGCAGCGACGTC
P-SETit.Gst-1:1:2      CAGGGTAGAGTGCCCATCACCCCTGACGCGAGCTAGTCTGCTTACGCAAGCAGCGACGTC
                       ************************************************************

P-SETit.Gst-1:1:1      ACAAGTGTAGTAAAAGGCCTCGTTGACCCACGACCAATCCACCGCTTCCTCTAGCACCTT
P-SETit.Gst-1:1:2      ACAAGTGTAGTAAAAGGCCTCGTTGACCCACGACCAATCCACCGCTTCCTCTAGCACCTT
                       ************************************************************

P-SETit.Gst-1:1:1      CTTCCCCGAGCACCGGCAGGCAGCAGCGAGATCTAGGCAGCAGCCATCGCTCCTCTTCTC
P-SETit.Gst-1:1:2      CTTCCCCGAGCACCGGCAGGCAGCAGCGAGATCTAGGCAGCAGCCATCGCTCCTCTTCTC
                       ************************************************************

P-SETit.Gst-1:1:1      CCCCCTGCTCCTGTATAAATAGCAGCAGGCAGGGGCAACCAATTCCATCAACTCGTATCA
P-SETit.Gst-1:1:2      CCCCCTGCTCCTGTATAAATAGCAGCAGGCAGGGGCAACCAATTCCATCAACTCGTATCA
                       ************************************************************

P-SETit.Gst-1:1:1      T
P-SETit.Gst-1:1:2      T
                       *
```

FIG. 5c

```
P-SETit.Ifr-1:1:2      TCCACCGATCATCACACACAGCCAGTAGTGGGGGTGGGCCAAGCAATCAGGCACCCGGCA
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2      ATGCGAGCTGATGCGTGATGATGGTGCTACCAACAAACTGACTATAAAATTTCTGATTTG
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2      AAAGGGATTGGCCTCGATATTTTATTAGCTCCCCGGCTTTTGTCACGACACGTTAGCATG
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2      CGTGCCTTCTAGAAGCTAGTCCGGGTATTACCGCTAGAAAGTTCCCGAAATGAAGCATTT
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2      ACCACCCGTAAAGCTCATTTTTCTTTATGATGAGTAGACACGGTACCAACATTGAGGACC
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2      GATTGGTTGGCTCCCAAAATCTGCCCTGCCAAACTAGGGCAAGTTCATAAATTTTGACAT
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2      TCGCTTGGTTGGCAATCAATTAAATCCTATTCTAAAATTCTTGCCTAGGTTTTGATATAA
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2      CATGCCCTATATTTTGGTCTACTCAAATTTTGGTATGGTAAATTTTGAACACCAACAAAT
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2      CAGGCTATTATTTATCTTATCTCTTTCTCAATTTCATTACACAGCAAGGCAGTAATTAAA
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2      AGGACCGTATATACAATGGATGTAAGAATAAAATGTATAAGTAGAAATATATTGGCATGC
P-SETit.Ifr-1:1:3      ------------------------------------------------------------
```

FIG. 6a

```
P-SETit.Ifr-1:1:2  CTCGTGCTGGTGCATGTCGATATGCTCTCAATTAGAAGTTGGAGACAGGTTATGCTTAGG
P-SETit.Ifr-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2  ATAGTCCCAACCTATGATATCTGTGTGTCTATACTGCCACATAAGTAAGACATCACTTTA
P-SETit.Ifr-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2  GAAATTACATTCTACAACCTATAATTTCTTAGTGTGGATCCTTAATTAATTCATCATCTC
P-SETit.Ifr-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2  TCCTCTCAATTCCTCATCAATTATGAAGACACCATCTTCTTCCAATGCAAATTTAACACT
P-SETit.Ifr-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2  GTCTAGGATCTAGGTTCAGGTGTTGATACTGGGTCTTGCATGAGATCCAGTTTCTTGTTC
P-SETit.Ifr-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2  TTCCAATTCTCTCTCATTTAATATATAATCACATAAGCAAAAGATCCTATGTAGCTGCAC
P-SETit.Ifr-1:1:3  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ifr-1:1:2  AATTAATGCTATGGAAACTATCCTAATCGGAGGGTTGGGACTGCTCCTGCCTATGGCGGC
P-SETit.Ifr-1:1:3  ----------------------------------------CCTGCCTATGGCGGC
                                                  **********

P-SETit.Ifr-1:1:2  TTATTCCCCATTTGCCTAACCTGAAAATCGAAAGGGAGTGCATGACAGGGCAAACACTAG
P-SETit.Ifr-1:1:3  TTATTCCCCATTTGCCTAACCTGAAAATCGAAAGGGAGTGCATGACAGGGCAAACACTAG
                   **********************************************************
```

FIG. 6b

```
P-SETit.Ifr-1:1:2  TGTTGCCTGCATCAATAATCGTCCATGATTATATAGAGGTAGCATGACTTTTTTAGGCGT
P-SETit.Ifr-1:1:3  TGTTGCCTGCATCAATAATCGTCCATGATTATATAGAGGTAGCATGACTTTTTTAGGCGT
                   ************************************************************

P-SETit.Ifr-1:1:2  CGTGTCCTAATCAATCAGAAAAGAAAGCCAACCTAATCGCTATGGGCCGCAACCACCGAT
P-SETit.Ifr-1:1:3  CGTGTCCTAATCAATCAGAAAAGAAAGCCAACCTAATCGCTATGGGCCGCAACCACCGAT
                   ************************************************************

P-SETit.Ifr-1:1:2  GCGACTATGCGAGTATATGGAACCCGTTGCTACTCCCCCACTATATATCGTGGAGTCTGA
P-SETit.Ifr-1:1:3  GCGACTATGCGAGTATATGGAACCCGTTGCTACTCCCCCACTATATATCGTGGAGTCTGA
                   ************************************************************

P-SETit.Ifr-1:1:2  TGGCAATCCAACGGCAGACG
P-SETit.Ifr-1:1:3  TGGCAATCCAACGGCAGACG
                   ********************
```

FIG. 6c

```
P-SETit.Nrt2-1:1:2      ACTATGGCGGGCGTGGTGAGACCCCCGCACGTGGTGTTTCTTCAAGGCGATGAGAGTGAG
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      GTGGAGTCCAACGGCGGATGTGGCGAGGTCCCCGCGCATTGTGTTATCGCGGTGGCGACT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      GCGAGGCAGCCTAAGAGAGGTCCGGATTCGGTGGTATCACTCTGTCAGATAGAGTGTGGT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      GTTGCAGCGGCACTACAGCGGAGGGTCTCGTATGGCGGTGGCCATCTCGGTGCAGTGCAG
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      TCTGTTTCTATCGGTTCCCTGTCGATGCCGGACCACGCCTAGACGTTTCGGCGAGTTATG
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      AGCGTGGATGTTGGTGGGTGCCGCCGTGGCGAGCAGAGCGGTGAGACCGTGTTGATGTCC
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      CAATCCAATCGGTAGGGTGTGATAGTTTTGGTGTTGAGTGGCTATCTGCATTGATGTCCT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      AATCCGACCAGGCGAGTTTGTATTGTTTTTCTTTTCTTTTCCTTTTATATTTTTTCAGTC
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      TGAAATTCTTTTTTTAATATAATCGGCAGCTCTCCAATATGGTTCGTTCAAAAAAAAGAA
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      TTTTTAAGAAAAGATAGATAAAAAGATAAACCAAATTCTGAATTGTGATTCAGATACCCT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      CGAAATGGAAGTTGGCCTGTCCACTTAAAATTGAACGCATGATTCCGTCAATAATTCAGT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------
```

FIG. 7a

```
P-SETit.Nrt2-1:1:2      GCCGTCCTCCTGTTTACTCTTTAATTCTTATTACGTGACATCGGCCCGTTGATAAGCCGT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      GCTCCTTGTCGCTAATTCTTATTACGTGCTGATAGAGGCGAGTCAATCAAACGTTGCACT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      TTGTAACCCTTAATCTTTGCTAAGAGTCACATGACCCCGTACATCTCGATCGATCCTCTT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      TTAGTTGGCGCGCGGGTTTTACCATGTGAAGCAATGTGCCGGCATGCTGCTGTCGCAACT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      AGCTCTTCATCAAGCTATCGACAGATGAGATGCGCTCCCATTGGAACCGAAATGGGTGGA
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      AATTCTGTTCGATTCTGTCGTGCCGACCGTGCGAAAGTGAAACCACCCTTCCCCTCGCCG
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      CAGGCATGTAGTCCGCGTGGATTTTGAACACCACAGCTGACATATGCCTCCATGTCCATT
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      CCTGCCGTGGGAATCTCTGCACCTGGTCTGCCTAGTCCTACAGGCTGCGGCCGCACCATC
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      TAAATGCATGTTTGAATATCAGTAGTTAAATTTTATCACATGTCACATCGGATATTCGGA
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      TGCTAATTAGTAGGACTAAACATAGCTAATTATAAAATTAATTGCAGAACTTCGGGGCTA
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2      ATTCATGAGACCAATTTATTGAGGCTAATTAATCTATCATTAGCAAATGGTTACTGTAGC
P-SETit.Nrt2-1:1:3      ------------------------------------------------------------
```

FIG. 7b

```
P-SETit.Nrt2-1:1:2  ACCATATTGTCAAATCATGGACTAATTAGCCTTAATAGATTTATCTCACAAATTAGACTC
P-SETit.Nrt2-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2  CATCTGTGTAATTAGTTTTATAATTAGATTATATTTAATACTTCTAATTAGTATCCAAAT
P-SETit.Nrt2-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Nrt2-1:1:2  ATCCGATGTGACTGTGAAGTTTAACACATGTGAGCCAAACACCCCCGACCACCCGGTCGC
P-SETit.Nrt2-1:1:3  ----------------------------------CCGACCACCCGGTCGC
                                                     ****************

P-SETit.Nrt2-1:1:2  CGCGCCGCGCCGCCGTTGGATGCCGCCTCGCCACGCCATGCGACGCAACGCCCTGCAC
P-SETit.Nrt2-1:1:3  CGCGCCGCGCCGCCGTTGGATGCCGCCTCGCCACGCCATGCGACGCAACGCCCTGCAC
                    **********************************************************

P-SETit.Nrt2-1:1:2  TGCATTTCGTGGCCTTGCGTAGGGGCACCGGAAGAGCCGCTGGTTCGTTTCGTTCGTCCC
P-SETit.Nrt2-1:1:3  TGCATTTCGTGGCCTTGCGTAGGGGCACCGGAAGAGCCGCTGGTTCGTTTCGTTCGTCCC
                    **********************************************************

P-SETit.Nrt2-1:1:2  CTGGCCGCGTCAGCTGATTTGCGAGCAGGGTCGAATCGATCGCGCGCGGTCGCCGCATCC
P-SETit.Nrt2-1:1:3  CTGGCCGCGTCAGCTGATTTGCGAGCAGGGTCGAATCGATCGCGCGCGGTCGCCGCATCC
                    **********************************************************

P-SETit.Nrt2-1:1:2  CACCAAGCCGGAGCCCTTCGGGGCCCCTCTAAAAGCAAGTCAGGCTCGCGAAGTGACCGA
P-SETit.Nrt2-1:1:3  CACCAAGCCGGAGCCCTTCGGGGCCCCTCTAAAAGCAAGTCAGGCTCGCGAAGTGACCGA
                    **********************************************************
```

FIG. 7c

```
P-SETit.Nrt2-1:1:2   AAAGATACATTACTACCAGCTGCAGCGCTGCTGTTGGCCCTGCCCTCGTCAAGATCTGAC
P-SETit.Nrt2-1:1:3   AAAGATACATTACTACCAGCTGCAGCGCTGCTGTTGGCCCTGCCCTCGTCAAGATCTGAC
                     ************************************************************

P-SETit.Nrt2-1:1:2   TTTTGAATCGCATAATTAGCAGCTTGTTTATTAAGCTTAAACGATTGATCCTACTCCTTG
P-SETit.Nrt2-1:1:3   TTTTGAATCGCATAATTAGCAGCTTGTTTATTAAGCTTAAACGATTGATCCTACTCCTTG
                     ************************************************************

P-SETit.Nrt2-1:1:2   CCGACA
P-SETit.Nrt2-1:1:3   CCGACA
                     ******
```

FIG. 7d

```
P-SETit.Ppc-1:1:3  CCATCTCTCCTTGAAAGAGAACTATGTTTAAGTTTCAACAAGAGACAACAATGCCCTTGT
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  GAACTGACAAAAGAGATAACAGGAAAAGACAAGGATTCGAGGAAGCAAGAAGGCAAGTGA
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  GCAGTGAATTGCAGTACTACCGAACAAGACTGATTTTTAGTACAGTACCTAATTATTTTG
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  GAATAATGAATAAGAGAGGATAATGTTGGACGAATAAAAATTGTGAACGGAAAATAACTA
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  GATATGTTTTGGGAGGCACTAACAAGACTTTAATTTGGAAGAGAGATACAAACATATAAA
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  CATGTTAGTGGATAGATAATATGGTGTCTTATGTTAGAAAAGTACATTATTTTTTATGGT
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  TATTTTCATAGATCTGGAACATTAATACAAAACTAATCCTATGGATACAAAACTGCATGA
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  AAAGTAATCATGAATTTATTCTAATATTGGGCATCATATTTAAGTCACGTTGCAGAATTT
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  GAACTTAAAACTCGATTCGTACGTGGAGAAACAAAAAAGATCAAATCTCATTAGAGGTAT
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  ATTGGACCATTTAAAGTAGTTTGGGGGAATAAATCGAGCCTAAGTTTTATTTAGGGGTTA
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  AGAGGACAGATAAAGTAGATTGGTGATGGTAGTAAAATGGACATTTTCCTAGTTGTATCT
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3  GGTATGTACTATTTGGCTTAACATATATTAAGTCCCAAGTAGTGCAAATTGGGATTCAAA
P-SETit.Ppc-1:1:4  ----------------------------------------------------------
```

FIG. 8a

```
P-SETit.Ppc-1:1:3       TACTAAATTCTCTTTACGTAGAGATGAGGAAGGAGAATTACAAAGCAGCATTGCCACAGC
P-SETit.Ppc-1:1:4       ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3       CTTGCTTCAGTTTTGCTCGATGCAAGCAGGGTGGAGTGGTGGACAGGCATGGACTAGCGG
P-SETit.Ppc-1:1:4       ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ppc-1:1:3       CACGGAAGACAACATCATGCATGTGCTTCCAGAGTTGCCAACGGCAAAAGAGCAGCAATG
P-SETit.Ppc-1:1:4       CACGGAAGACAACATCATGCATGTGCTTCCAGAGTTGCCAACGGCAAAAGAGCAGCAATG
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       TGTGTAGTTCGGCCATGGGCTCGGTCACAGGTGGGTTCGTCTCCCAGAACAGGCAGGAGA
P-SETit.Ppc-1:1:4       TGTGTAGTTCGGCCATGGGCTCGGTCACAGGTGGGTTCGTCTCCCAGAACAGGCAGGAGA
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       GGGGGTAGCTGGCTGAGCATCCATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCAAACGGGCAGC
P-SETit.Ppc-1:1:4       GGGGGTAGCTGGCTGAGCATCCATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCAAACGGGCAGC
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       TGGAGAGATAATGCGAATATGTGATCCTCCACGGCGTTGCCACAGATGTCACGGATCATG
P-SETit.Ppc-1:1:4       TGGAGAGATAATGCGAATATGTGATCCTCCACGGCGTTGCCACAGATGTCACGGATCATG
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       CATGCATGTCGTCATTTAGCAGATGTTTGAGTCTGATACACCCTTCACACCAAGCAAATT
P-SETit.Ppc-1:1:4       CATGCATGTCGTCATTTAGCAGATGTTTGAGTCTGATACACCCTTCACACCAAGCAAATT
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       ATAACCAAGATAAGGATTCGAGGAAGCAGAAGGAGGCAAGTGAGCAGTGACAAGTACGTC
P-SETit.Ppc-1:1:4       ATAACCAAGATAAGGATTCGAGGAAGCAGAAGGAGGCAAGTGAGCAGTGACAAGTACGTC
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       CACAACACAATCCAGACGAAAACGAACACATCAATGCCCTCGGCGCCAATCGTAGTAATG
P-SETit.Ppc-1:1:4       CACAACACAATCCAGACGAAAACGAACACATCAATGCCCTCGGCGCCAATCGTAGTAATG
                        ************************************************************
```

FIG. 8b

```
P-SETit.Ppc-1:1:3       CTGCAACAAACAAAGTCCTGTGAAGACGGTCTCTATTAAATAGCCACACATGGAGCCGAT
P-SETit.Ppc-1:1:4       CTGCAACAAACAAAGTCCTGTGAAGACGGTCTCTATTAAATAGCCACACATGGAGCCGAT
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       ATATAATCCGAAAGATAATGTAATAATAGAGAAGCGTCATGTTTTTTCAAAAATAAAAAT
P-SETit.Ppc-1:1:4       ATATAATCCGAAAGATAATGTAATAATAGAGAAGCGTCATGTTTTTTCAAAAATAAAAAT
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       AAAAATAAACTGGGAACAAGCCCATCGCAAGGCCGGGAGCGAGCTTGCTTTTCAGAGTCA
P-SETit.Ppc-1:1:4       AAAAATAAACTGGGAACAAGCCCATCGCAAGGCCGGGAGCGAGCTTGCTTTTCAGAGTCA
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       GTGAGCCACCGGGCGGGAGCTGACGGGTAGGGGAAGAGGAAGACAACATCGTGCATGTGC
P-SETit.Ppc-1:1:4       GTGAGCCACCGGGCGGGAGCTGACGGGTAGGGGAAGAGGAAGACAACATCGTGCATGTGC
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       TTCAAGAGTTGCCAACGGCAAAGGAGCAGCAGTGTGTGTAGTTCGGCTATGGGCTCAGTC
P-SETit.Ppc-1:1:4       TTCAAGAGTTGCCAACGGCAAAGGAGCAGCAGTGTGTGTAGTTCGGCTATGGGCTCAGTC
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       ACAGGTGGGTTTCGTCTCCCAGAACCAGCAGGAGAGGGGGTTTGTGGCTGGCTGTGCATC
P-SETit.Ppc-1:1:4       ACAGGTGGGTTTCGTCTCCCAGAACCAGCAGGAGAGGGGGTTTGTGGCTGGCTGTGCATC
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       CATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCAAATGGACACCTGGAGCGATAATGTGAATATG
P-SETit.Ppc-1:1:4       CATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCAAATGGACACCTGGAGCGATAATGTGAATATG
                        ************************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3       TGATCCTCCACGGCGTTGCCACAAATGTCACTGATCATCCATGTTGTCCTATAGCACATG
P-SETit.Ppc-1:1:4       TGATCCTCCACGGCGTTGCCACAAATGTCACTGATCATCCATGTTGTCCTATAGCACATG
                        ************************************************************
```

FIG. 8c

```
P-SETit.Ppc-1:1:3  CTTGAGTCCAAGTCCCTCCACACCAAGCAAATTATAGCCAAGACAAGGATTCAAGGAAGC
P-SETit.Ppc-1:1:4  CTTGAGTCCAAGTCCCTCCACACCAAGCAAATTATAGCCAAGACAAGGATTCAAGGAAGC
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  AAGAAGGCGAGTGAGCAGTGACAAAGTATGTCCACAGCACAATCCGTACGAAAACGAGCG
P-SETit.Ppc-1:1:4  AAGAAGGCGAGTGAGCAGTGACAAAGTATGTCCACAGCACAATCCGTACGAAAACGAGCG
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  CATCAGTGCCCTCAGCGCCAATCGTAGTGTTTCCGCATCAAATAAGTCCTGTGAAGCCGG
P-SETit.Ppc-1:1:4  CATCAGTGCCCTCAGCGCCAATCGTAGTGTTTCCGCATCAAATAAGTCCTGTGAAGCCGG
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  TCTCTATTAAATTGCCACGTATGAAGCCGATGTGTGGTCCGAAAGATAATATGCAATAAT
P-SETit.Ppc-1:1:4  TCTCTATTAAATTGCCACGTATGAAGCCGATGTGTGGTCCGAAAGATAATATGCAATAAT
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  AGAGAAGCGTTATGTTTTCCCTGAAAAAAACCTGGGAACAAGCCTGTCGCAAGGCCGGGA
P-SETit.Ppc-1:1:4  AGAGAAGCGTTATGTTTTCCCTGAAAAAAACCTGGGAACAAGCCTGTCGCAAGGCCGGGA
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  GCCTCGCTTCCGTCTTGCTTTTTCACAGTCAGTGAGCCACCGGGCGGGAGCTGACGGGTA
P-SETit.Ppc-1:1:4  GCCTCGCTTCCGTCTTGCTTTTTCACAGTCAGTGAGCCACCGGGCGGGAGCTGACGGGTA
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  GGGGAAGAGGAAGACAGCACCGTGCATGTGCTTCCAGAGTTGCCAACGGCAAATGAGCAG
P-SETit.Ppc-1:1:4  GGGGAAGAGGAAGACAGCACCGTGCATGTGCTTCCAGAGTTGCCAACGGCAAATGAGCAG
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  CAGTGTGTGTAGTTCGGCCATGGGCTCGGTCACAGGTGGGTTTCGTCTCCCAGAACCAGC
P-SETit.Ppc-1:1:4  CAGTGTGTGTAGTTCGGCCATGGGCTCGGTCACAGGTGGGTTTCGTCTCCCAGAACCAGC
                   **********************************************************
```

FIG. 8d

```
P-SETit.Ppc-1:1:3  AGGAGAGGGGGTATGTGGCTGGCTGTGCATCCATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCA
P-SETit.Ppc-1:1:4  AGGAGAGGGGGTATGTGGCTGGCTGTGCATCCATCCGTGATGAGCCTAAACCGTTGCGCA
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  AACGGACACCTAGAGCGATAATGTATATGTGATCCTCCACGGCGTTGCCACAAATGTCAC
P-SETit.Ppc-1:1:4  AACGGACACCTAGAGCGATAATGTATATGTGATCCTCCACGGCGTTGCCACAAATGTCAC
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  TGATCATGCATGTTGTCCTATATAGCACATGCTTGAGTCCAAGTCCCTCCACACCAAGCA
P-SETit.Ppc-1:1:4  TGATCATGCATGTTGTCCTATATAGCACATGCTTGAGTCCAAGTCCCTCCACACCAAGCA
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  AATTAATTATAGCCAAGAGAAGGATTCGAGGAAGAAGAAGGCGATTGAGCAGTGACAAGT
P-SETit.Ppc-1:1:4  AATTAATTATAGCCAAGAGAAGGATTCGAGGAAGAAGAAGGCGATTGAGCAGTGACAAGT
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  ACGTCGACAGCACACAACCCAGACGACGAAAACCAGGCAACGAGCACACATCGCTCCGCAGCGCTGC
P-SETit.Ppc-1:1:4  ACGTCGACAGCACACAACCCAGACGACGAAAACCAGGCAACGAGCACACATCGCTCCGCAGCGCTGC
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  CCCTCGGCCCTCCCCTTGCATTCGTGATTCGCCGCCGGTCACATGCCCTCCGCTTGAAAA
P-SETit.Ppc-1:1:4  CCCTCGGCCCTCCCCTTGCATTCGTGATTCGCCGCCGGTCACATGCCCTCCGCTTGAAAA
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  AAAAAAAAGCCCCCCTTTCCATCCGCCATGAGGCGTGCAATCCCGTGCACACACTCGCCGA
P-SETit.Ppc-1:1:4  AAAAAAAAGCCCCCCTTTCCATCCGCCATGAGGCGTGCAATCCCGTGCACACACTCGCCGA
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  CTCCCCATCCGTTATTTGTTTTTTTTAGAAGCCCCATCCGTTATTTAAACCCACCCGCG
P-SETit.Ppc-1:1:4  CTCCCCATCCGTTATTTGTTTTTTTTAGAAGCCCCATCCGTTATTTAAACCCACCCGCG
                   **********************************************************

P-SETit.Ppc-1:1:3  CGCCTCGCTCGACCTCGTGCCA
P-SETit.Ppc-1:1:4  CGCCTCGCTCGACCTCGTGCCA
                   ***********************
```

FIG. 8e

```
P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  ACGCAAATGACAAATAATGGTTACACCAAAATAGGTTAACGCAAATGACAAATAATGGTT

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  ACACAAAACTGCAGTCTAATCTGTTTATGAAATCTATCATATACCTGTAGCTTGAAAGCA

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  ACTGCTAGCACGAGCAAACATCTCGAATGACAAATAATGGTTTCTCCACTCATCTGCAAA

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  TAAGAAAATCGCTCAGGCAAAATCTCTTAAAGTGCGAAAAATGTGGAGTTGAACAAAAT

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  AAATCACTACCGACACATTATTCTGAGGGGCAAAACGCAGATCCGGGCCACAAAGCAACC

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  GGATTAGAAGCTGACAAGCTTGGAGGCTGTGTTGACTCAACGAGCTTGGAGATTGGCAGA

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  TCCGGTGAAGGTGGCTGCAGATCTGTGCAGGGAGTTGTCAATGCACAAGTACTATCATTC

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  TAAACTAGGATTAGCTTCTACTGCTCACCTTTTTACAAGCAGTCAAAGTCAGCATGCGGT

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  GGCACCAGCGGAAGGATCGGGCTTGTAACGACAGTTTCTGATGTTAATCGCGTGCTTCAG

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  AGATTGAGTAAAGTGCTGTTAATTTTCCAGAAGCCTAGGAAAAAACACATCTGGACCCTA

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  CCTTAAGCAACAACACGTCATGCTTCACAGAATAGCAGCATTATAATCCTGTCAAACAAT
```

FIG. 9a

```
P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  ACCACTTTTGCAATATGTCAAACAAAACACATGGATAAACTGAAATGAAGTCATCCCTTT

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  GAAGCCAAGGGTAGTCTCCCGATAGTCAACAAAGTATTCTTCGACGACCATCACATACAC

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  ACATACAACTAGCAGCATCATAAATCATAACAGTGATCTGAACGGAAATTGTTAGACGATTT

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  ACATTTCCTCGCTATAGATTTATTCAAAATAAGGCCAAACATCTTCTATGGATGTTCTAA

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  TCATAACTAATGTAACATCAAGAGAAAAAAGGTAATGCTTTGACCAAATTGGTGAAATAT

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  GGTAATATAACACATTATAATTATGAACCTAATCAAAGTGTTCTGGGCCACATAAAATAA

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  ATTAAAAGATATTTGCCAACGAATATAATGCCTTCTTTTTTAATCAATGCTTGCTTACAA

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  ATTACAAGCATATCCCTGTGAGGGGCACACAAAATCTGGCCACCACATCCGGGTTTGGTA

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  GAAGAAACATCATATCAGAATAACATATACATTAAACAGCTCTCCGATCAGTTGCGTAAT

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  AACATATCAGAATAACATCATATCTAGATATAGTATATGTCTAGATGCATAATAATATCT

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  ATAAATTTAGAAAAGCTAAAACGACCTACAATTTGGAATGGAGGGAGTAGTTGTTTTCTT

P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  TATTTAGAGTTCGATCGGTTACGTAATAGTTTCCTTTAATTATTCATGGCAGCTTCCACT
```

FIG. 9b

```
P-SETit.Prx3-1:1:3  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Prx3-1:1:4  GACTTACTAAGAAATCATAGACAAATTATTTTCAGCTGATGCATGACAAAAAATAAATAA

P-SETit.Prx3-1:1:3  ------CCTACCTACTAAAAACTTTGGCCCTTTCTTCTCAGAAATGTTGGTAAGAGTAAAT
P-SETit.Prx3-1:1:4  TGCTTGCCTACCTACTAAAAACTTTGGCCCTTTCTTCTCAGAAATGTTGGTAAGAGTAAAT
                    ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3  TACCAGAGTAGACCGGGAAAGGGGAGGAGGAGAACATAAGACAGCTATGAATCAGGAGCC
P-SETit.Prx3-1:1:4  TACCAGAGTAGACCGGGAAAGGGGAGGAGGAGAACATAAGACAGCTATGAATCAGGAGCC
                    ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3  TAGTCAAATGAGCAGGTAACCTTGTCCATGTCACTTTTTTTTTTGGTCTCCTCCAGGGTT
P-SETit.Prx3-1:1:4  TAGTCAAATGAGCAGGTAACCTTGTCCATGTCACTTTTTTTTTTGGTCTCCTCCAGGGTT
                    ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3  CAGCAGTTGCTTGGGATGCTAAAAGTTTGTGACCTCTTTTGAGGCATGTAACATGCTATC
P-SETit.Prx3-1:1:4  CAGCAGTTGCTTGGGATGCTAAAAGTTTGTGACCTCTTTTGAGGCATGTAACATGCTATC
                    ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3  AGTATAGTTGCTAGGGATATAAAATTTTACTCCTCTACCATATGCAAGAAGCCACCGAACC
P-SETit.Prx3-1:1:4  AGTATAGTTGCTAGGGATATAAAATTTTACTCCTCTACCATATGCAAGAAGCCACCGAACC
                    ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3  TATCTGCTCTTTGCAATGCATTCATGACAAACTACAGATGTGCATGCCTCTCTGAAGT
P-SETit.Prx3-1:1:4  TATCTGCTCTTTGCAATGCATTCATGACAAACTACAGATGTGCATGCCTCTCTGAAGT
                    ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3  CTTCTGACAGTAACTACCCTAAAAAAAAATCTTCTGACAGTAACTGCCCTAAAAAAAAGTA
P-SETit.Prx3-1:1:4  CTTCTGACAGTAACTACCCTAAAAAAAAATCTTCTGACAGTAACTGCCCTAAAAAAAAGTA
                    ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3  TGCTGACAGTAACAAAGCACGCTGTTGTTTTGTTCCTTGAAGGAACCGGCCACTGATACG
P-SETit.Prx3-1:1:4  TGCTGACAGTAACAAAGCACGCTGTTGTTTTGTTCCTTGAAGGAACCGGCCACTGATACG
                    ************************************************************
```

FIG. 9c

```
P-SETit.Prx3-1:1:3      TGCTGCACGGAAGAACCAAGCTTTCTCCCGACCTGTTTGAGTTTGGAAGCTTTCAAACAA
P-SETit.Prx3-1:1:4      TGCTGCACGGAAGAACCAAGCTTTCTCCCGACCTGTTTGAGTTTGGAAGCTTTCAAACAA
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      ACAACATCCAAGCTAAGTCCTTCCAGGAACCTGCTGCTGCTCTCGTGACAAGAATGTAGG
P-SETit.Prx3-1:1:4      ACAACATCCAAGCTAAGTCCTTCCAGGAACCTGCTGCTGCTCTCGTGACAAGAATGTAGG
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      CCATGCGAGCACCTAACACACGGATCATCACGCGCCGTGTGGCTCAGAGTTGGTACACCA
P-SETit.Prx3-1:1:4      CCATGCGAGCACCTAACACACGGATCATCACGCGCCGTGTGGCTCAGAGTTGGTACACCA
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      CATCATATCGCCTGGATTGGTCTGTGTACTTGTGTCCCCTGGGAAAATCAGTCACTTATT
P-SETit.Prx3-1:1:4      CATCATATCGCCTGGATTGGTCTGTGTACTTGTGTCCCCTGGGAAAATCAGTCACTTATT
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      TTTAGACCCCTGGATTGAACACAGAATAATGCAATGCAACCATGTTAAGCATGTTGTGCA
P-SETit.Prx3-1:1:4      TTTAGACCCCTGGATTGAACACAGAATAATGCAATGCAACCATGTTAAGCATGTTGTGCA
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      CAGCCGTTTGACAAGCCATTCCCCATCTTTCATGTAGTGATCCTCACCTAGCTAATGTAA
P-SETit.Prx3-1:1:4      CAGCCGTTTGACAAGCCATTCCCCATCTTTCATGTAGTGATCCTCACCTAGCTAATGTAA
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      CACGGCAAAACTACCCTAATTTGGCAGTAGAACTCTGATGTATGGAACCATGACGAATAA
P-SETit.Prx3-1:1:4      CACGGCAAAACTACCCTAATTTGGCAGTAGAACTCTGATGTATGGAACCATGACGAATAA
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      ATGGAAAATCTTAGACGCTACTCACTACTCATCTTGAATCCCAGAAGCTTGTGTACCTTT
P-SETit.Prx3-1:1:4      ATGGAAAATCTTAGACGCTACTCACTACTCATCTTGAATCCCAGAAGCTTGTGTACCTTT
                        ************************************************************
```

FIG. 9d

```
P-SETit.Prx3-1:1:3      CATTATCATTTCCACAAAGACAGGGATACTGATACGTGTTCAATGATGACCGAACCATTA
P-SETit.Prx3-1:1:4      CATTATCATTTCCACAAAGACAGGGATACTGATACGTGTTCAATGATGACCGAACCATTA
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      AAAACCAAAGAAACCAGGGGCATAGTCTGCATATGGTCGTCATTAATATAGTAAATTAAG
P-SETit.Prx3-1:1:4      AAAACCAAAGAAACCAGGGGCATAGTCTGCATATGGTCGTCATTAATATAGTAAATTAAG
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      TTCAAACTGTAACAACCCTTGTGTATAACAAAAGAAGCTGGACTAACTATGAAGCAAAAC
P-SETit.Prx3-1:1:4      TTCAAACTGTAACAACCCTTGTGTATAACAAAAGAAGCTGGACTAACTATGAAGCAAAAC
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      CATGCTTTTCGCCGAGGCTCCTCTGAACTTTGGTTGCTTGGTTTCACATAGTGTTAAACT
P-SETit.Prx3-1:1:4      CATGCTTTTCGCCGAGGCTCCTCTGAACTTTGGTTGCTTGGTTTCACATAGTGTTAAACT
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      GTTAATAAGCGAGGTTATATAGTTCGGGTGAATATATTACTACTGGGACGAACTGATATC
P-SETit.Prx3-1:1:4      GTTAATAAGCGAGGTTATATAGTTCGGGTGAATATATTACTACTGGGACGAACTGATATC
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      TACCACTAATCTACTGTAAAGCTGCCTAATTTTGCTGTAGCTAGATTTCCCGGAAGGGGG
P-SETit.Prx3-1:1:4      TACCACTAATCTACTGTAAAGCTGCCTAATTTTGCTGTAGCTAGATTTCCCGGAAGGGGG
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      CTCTTGTATGCTGCAGAGGACATATTCAACTGATCAATTTATAGACAGAAAGTTGCATAT
P-SETit.Prx3-1:1:4      CTCTTGTATGCTGCAGAGGACATATTCAACTGATCAATTTATAGACAGAAAGTTGCATAT
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      TCTATCATTGTGCCTAGCCCCTAGCTATATGATCAGCATAATCAGCAATCCATCATATCT
P-SETit.Prx3-1:1:4      TCTATCATTGTGCCTAGCCCCTAGCTATATGATCAGCATAATCAGCAATCCATCATATCT
                        ************************************************************
```

FIG. 9e

```
P-SETit.Prx3-1:1:3      TCTTCTCAGTGTTTTTTTTTTGCTGGGCGAAACAATATTCTTTATTTCAGTTCAATCCT
P-SETit.Prx3-1:1:4      TCTTCTCAGTGTTTTTTTTTTGCTGGGCGAAACAATATTCTTTATTTCAGTTCAATCCT
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      GTTTAAGCAGCACTTGCTGTTTCTGCAGTAACCTGTAACCGTACTGTACCTACTGCTGAC
P-SETit.Prx3-1:1:4      GTTTAAGCAGCACTTGCTGTTTCTGCAGTAACCTGTAACCGTACTGTACCTACTGCTGAC
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      TTGTCGCTTCTGAGTGGAAAAATGTCTCACCTGATCAGAAACGATTTCTTCGCCTACAAT
P-SETit.Prx3-1:1:4      TTGTCGCTTCTGAGTGGAAAAATGTCTCACCTGATCAGAAACGATTTCTTCGCCTACAAT
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      TATTTGGGACTAGAAGCTCAATGCTGTCCATGCAAATTTCGGTTAAAACTGAAGCATCAA
P-SETit.Prx3-1:1:4      TATTTGGGACTAGAAGCTCAATGCTGTCCATGCAAATTTCGGTTAAAACTGAAGCATCAA
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      CAGTCAAAATGTCAGCTAAAACTGAGGCATCAACAGTCATACTTGCAGCCAGATGGAAGA
P-SETit.Prx3-1:1:4      CAGTCAAAATGTCAGCTAAAACTGAGGCATCAACAGTCATACTTGCAGCCAGATGGAAGA
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      ACAACCGTAGCAGTTGGACACAATGTGGAGTCGACCTAGCTCGCTCGTTTGCTCACCCTC
P-SETit.Prx3-1:1:4      ACAACCGTAGCAGTTGGACACAATGTGGAGTCGACCTAGCTCGCTCGTTTGCTCACCCTC
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      TTATTCTATAAGCATCACCCTAACAAATCCCTAACCACCTTCCCTTCGTTACACACATGC
P-SETit.Prx3-1:1:4      TTATTCTATAAGCATCACCCTAACAAATCCCTAACCACCTTCCCTTCGTTACACACATGC
                        ************************************************************

P-SETit.Prx3-1:1:3      TAGCTGCCTCCCTCCAGCTATAAATAGCACCCAAAGCCCATCTCATCTGGCCAT
P-SETit.Prx3-1:1:4      TAGCTGCCTCCCTCCAGCTATAAATAGCACCCAAAGCCCATCTCATCTGGCCAT
                        ***************************************************
```

FIG. 9f

```
P-SETit.Rcc3-1:1:1      TATCGGCGACCGCTAAGAGAAGACATTTAAAATAAGTAGTCGGCATTGTGATAAAAAGAG
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     -----------------------------------GTCGGCATTGTGATAAAAAGAG

P-SETit.Rcc3-1:1:1      AGCGCGATTACTGATGTGCAGGTTCTCGATTGTTGATGAAGTCGACTAGTCGGAGTCGAT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     AGCGCGATTACTGATGTGCAGGTTCTCGATTGTTGATGAAGTCGACTAGTCGGAGTCGAT

P-SETit.Rcc3-1:1:1      TCTGACTAGTTATTGATTGTATGGAACCCGCCCTCGACTAGTTTTCTAGTCGAGACGAGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     TCTGACTAGTTATTGATTGTATGGAACCCGCCCTCGACTAGTTTTCTAGTCGAGACGAGT

P-SETit.Rcc3-1:1:1      AGTCGAAGTAGACCATCCTCAACTACTTTTCTAGTTGAGATGAGTAGTCGAAGTAGTCGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     AGTCGAAGTAGACCATCCTCAACTACTTTTCTAGTTGAGATGAGTAGTCGAAGTAGTCGT

P-SETit.Rcc3-1:1:1      CGGCGACTTGATTATTTGCCTCAATCTGTGTGTGACTTGATCGACGAGCCGTATGCAGCA
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     CGGCGACTTGATTATTTGCCTCAATCTGTGTGTGACTTGATCGACGAGCCGTATGCAGCA

P-SETit.Rcc3-1:1:1      GCTTGCGGTGGAAACCGACTCAGTCTTCGATTGGAACACGGAGCGCGTCAATTCTATGTC
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     GCTTGCGGTGGAAACCGACTCAGTCTTCGATTGGAACACGGAGCGCGTCAATTCTATGTC
```

FIG. 10a

```
P-SETit.Rcc3-1:1:1      GACGTAGATTTGTCTGCTTGGAACTCCAACTCAGTGACTTGCTTCTTGTTGAGTAGATTG
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     GACGTAGATTTGTCTGCTTGGAACTCCAACTCAGTGACTTGCTTCTTGTTGAGTAGATTG

P-SETit.Rcc3-1:1:1      ATCTTGATGATGAGGTCCTTCAAGCTCGCCTGATGATCTCGACGATCACCTCTACCTGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     ATCTTGATGATGAGGTCCTTCAAGCTCGCCTGATGATCTCGACGATCACCTCTACCTGAC

P-SETit.Rcc3-1:1:1      GCGCCAACTGTTGGTGCTTAGACCCAGCAACCTACCGAGGGGGTACCCGAGGTAGTGTTT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ------------------AGACCCAGCAACCTACCGAGGGGGTACCCGAGGTAGTGTTT
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     GCGCCAACTGTTGGTGCTTAGACCCAGCAACCTACCGAGGGGGTACCCGAGGTAGTGTTT

P-SETit.Rcc3-1:1:1      TGTGGTGGGGCTCGTCGAAGATCAGGAACTTGAAGGTGAACTCGAACACACGATTTAGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10     TGTGGTGGGGCTCGTCGAAGATCAGGAACTTGAAGGTGAACTCGAACACACGATTTAGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     TGTGGTGGGGCTCGTCGAAGATCAGGAACTTGAAGGTGAACTCGAACACACGATTTAGAC

P-SETit.Rcc3-1:1:1      AAGTTCGGGCTGCTTATGCCGCATAATACCCCATGTCATGTGTGTTGGTTGGATTGTATT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     AAGTTCGGGCTGCTTATGCCGCATAATACCCCATGTCATGTGTGTTGGTTGGATTGTATT
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     AAGTTCGGGCTGCTTATGCCGCATAATACCCCATGTCATGTGTGTTGGTTGGATTGTATT

P-SETit.Rcc3-1:1:1      GATTGATCAGATATTTGGAGGGGGCCCTGCCTCGCCTTATATTGCCCATTGCCGGAGGCA
P-SETit.Rcc3-1:1:10     GATTGATCAGATATTTGGAGGGGGCCCTGCCTCGCCTTATATTGCCCATTGCCGGAGGCA
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     GATTGATCAGATATTTGGAGGGGGCCCTGCCTCGCCTTATATTGCCCATTGCCGGAGGCA
```

FIG. 10b

```
P-SETit.Rcc3-1:1:1      GGGCTACAGGTCGGTTGTTGTACAAGAGTACTAGTCGGTTTTGACCAGCGAGTCCTACTC
P-SETit.Rcc3-1:1:10     GGGCTACAGGTCGGTTGTTGTACAAGAGTACTAGTCGGTTTTGACCAGCGAGTCCTACTC
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     GGGCTACAGGTCGGTTGTTGTACAAGAGTACTAGTCGGTTTTGACCAGCGAGTCCTACTC

P-SETit.Rcc3-1:1:1      TAATTGCTACAAGTAGTTTCCTAATCCTTGACTAGTCCTTGTCCGCCACGTAGACCACGA
P-SETit.Rcc3-1:1:10     TAATTGCTACAAGTAGTTTCCTAATCCTTGACTAGTCCTTGTCCGCCACGTAGACCACGA
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     TAATTGCTACAAGTAGTTTCCTAATCCTTGACTAGTCCTTGTCCGCCACGTAGACCACGA

P-SETit.Rcc3-1:1:1      CGTCTTGCACCTAGTCTCTGTGTTTGATACATCTTGGTGTACAGTCCGATATTGTAGGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10     CGTCTTGCACCTAGTCTCTGTGTTTGATACATCTTGGTGTACAGTCCGATATTGTAGGAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     CGTCTTGCACCTAGTCTCTGTGTTTGATACATCTTGGTGTACAGTCCGATATTGTAGGAC

P-SETit.Rcc3-1:1:1      TATCCAAGCTTCCCAGTAGGCCCATAGATGTATGGCCGACAACTGGATAATGTAACTCTG
P-SETit.Rcc3-1:1:10     TATCCAAGCTTCCCAGTAGGCCCATAGATGTATGGCCGACAACTGGATAATGTAACTCTG
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     TATCCAAGCTTCCCAGTAGGCCCATAGATGTATGGCCGACAACTGGATAATGTAACTCTG

P-SETit.Rcc3-1:1:1      GGTCAGTACTATCCTTATCTATATAGACACAAACAACGTACTATAGCAGAAGTTTAAGCT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     GGTCAGTACTATCCTTATCTATATAGACACAAACAACGTACTATAGCAGAAGTTTAAGCT
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     GGTCAGTACTATCCTTATCTATATAGACACAAACAACGTACTATAGCAGAAGTTTAAGCT

P-SETit.Rcc3-1:1:1      CGTAACCCACCAATATTTGGTGGCATAGACCACGTATTGCTGATATAGTGCTCGTAACCC
P-SETit.Rcc3-1:1:10     CGTAACCCACCAATATTTGGTGGCATAGACCACGTATTGCTGATATAGTGCTCGTAACCC
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ------------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16     CGTAACCCACCAATATTTGGTGGCATAGACCACGTATTGCTGATATAGTGCTCGTAACCC
```

FIG. 10c

```
P-SETit.Rcc3-1:1:1   ACCAATATTTCGTGGCATAGAGATCTCTTAGGCAATAAATTAGCAGTACGAAACAATCTA
P-SETit.Rcc3-1:1:10  ACCAATATTTCGTGGCATAGAGATCTCTTAGGCAATAAATTAGCAGTACGAAACAATCTA
P-SETit.Rcc3-1:1:11  ----------------------------------------------------------
P-SETit.Rcc3-1:1:16  ACCAATATTTCGTGGCATAGAGATCTCTTAGGCAATAAATTAGCAGTACGAAACAATCTA

P-SETit.Rcc3-1:1:1   TGTCCACGTGTTGCTAATACAATGTTCTAAACCTTACAGCCTACTGGACAGTTCTCTAGC
P-SETit.Rcc3-1:1:10  TGTCCACGTGTTGCTAATACAATGTTCTAAACCTTACAGCCTACTGGACAGTTCTCTAGC
P-SETit.Rcc3-1:1:11  ------GTGTTGCTAATACAATGTTCTAAACCTTACAGCCTACTGGACAGTTCTCTAGC
P-SETit.Rcc3-1:1:16  TGTCCACGTGTTGCTAATACAATGTTCTAAACCTTACAGCCTACTGGACAGTTCTCTAGC
                     **********************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1   CATGATACATGTGCATGTCCGAACAAATATTTATGGGTACCCGAAAGGTTAATTTTTGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10  CATGATACATGTGCATGTCCGAACAAATATTTATGGGTACCCGAAAGGTTAATTTTTGT
P-SETit.Rcc3-1:1:11  CATGATACATGTGCATGTCCGAACAAATATTTATGGGTACCCGAAAGGTTAATTTTTGT
P-SETit.Rcc3-1:1:16  CATGATACATGTGCATGTCCGAACAAATATTTATGGGTACCCGAAAGGTTAATTTTTGT
                     **********************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1   AGTATTTATGAGGGGGAGGGGGCGTTGACGAAAAAAATAACTTAGCTAAGCGTAATTGG
P-SETit.Rcc3-1:1:10  AGTATTTATGAGGGGGAGGGGGCGTTGACGAAAAAAATAACTTAGCTAAGCGTAATTGG
P-SETit.Rcc3-1:1:11  AGTATTTATGAGGGGGAGGGGGCGTTGACGAAAAAAATAACTTAGCTAAGCGTAATTGG
P-SETit.Rcc3-1:1:16  AGTATTTATGAGGGGGAGGGGGCGTTGACGAAAAAAATAACTTAGCTAAGCGTAATTGG
                     **********************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1   CTTAAAAACATACAATGTTGTTCCAGCATCAAGCCTACGTGATCATTTCACAAAACCAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10  CTTAAAAACATACAATGTTGTTCCAGCATCAAGCCTACGTGATCATTTCACAAAACCAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11  CTTAAAAACATACAATGTTGTTCCAGCATCAAGCCTACGTGATCATTTCACAAAACCAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:16  CTTAAAAACATACAATGTTGTTCCAGCATCAAGCCTACGTGATCATTTCACAAAACCAAC
                     **********************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1   TCAAAAGATAGGTGTCATGTTCCTTTTAGTGCAAAACTTAAGGACACCTACCTTGCAAAA
P-SETit.Rcc3-1:1:10  TCAAAAGATAGGTGTCATGTTCCTTTTAGTGCAAAACTTAAGGACACCTACCTTGCAAAA
P-SETit.Rcc3-1:1:11  TCAAAAGATAGGTGTCATGTTCCTTTTAGTGCAAAACTTAAGGACACCTACCTTGCAAAA
P-SETit.Rcc3-1:1:16  TCAAAAGATAGGTGTCATGTTCCTTTTAGTGCAAAACTTAAGGACACCTACCTTGCAAAA
                     **********************************************************
```

FIG. 10d

```
P-SETit.Rcc3-1:1:1      CTTAGCTTTGTTACCCAGAATGAACCGCTAAGCTCGAGGAGCTCTGAACTTACATGACCA
P-SETit.Rcc3-1:1:10     CTTAGCTTTGTTACCCAGAATGAACCGCTAAGCTCGAGGAGCTCTGAACTTACATGACCA
P-SETit.Rcc3-1:1:11     CTTAGCTTTGTTACCCAGAATGAACCGCTAAGCTCGAGGAGCTCTGAACTTACATGACCA
P-SETit.Rcc3-1:1:16     CTTAGCTTTGTTACCCAGAATGAACCGCTAAGCTCGAGGAGCTCTGAACTTACATGACCA
                        ************************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1      AATATATTAAACACAAAAGTCATGCATGATTTTCTTTAATAAGTATCGAGCAATATGGTT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     AATATATTAAACACAAAAGTCATGCATGATTTTCTTTAATAAGTATCGAGCAATATGGTT
P-SETit.Rcc3-1:1:11     AATATATTAAACACAAAAGTCATGCATGATTTTCTTTAATAAGTATCGAGCAATATGGTT
P-SETit.Rcc3-1:1:16     AATATATTAAACACAAAAGTCATGCATGATTTTCTTTAATAAGTATCGAGCAATATGGTT
                        ************************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1      CGGGTGTCTTTCGTCTCATACCTCTATTGTCCTCCGTGATCAACAAGGGTGGATCCGGGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     CGGGTGTCTTTCGTCTCATACCTCTATTGTCCTCCGTGATCAACAAGGGTGGATCCGGGT
P-SETit.Rcc3-1:1:11     CGGGTGTCTTTCGTCTCATACCTCTATTGTCCTCCGTGATCAACAAGGGTGGATCCGGGT
P-SETit.Rcc3-1:1:16     CGGGTGTCTTTCGTCTCATACCTCTATTGTCCTCCGTGATCAACAAGGGTGGATCCGGGT
                        ************************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1      GGTGCAAGGGGGCTCAAGCCCCCCTACCTCTCCCAAAGGAGAAAGAAGGGAGAAGAAAGT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     GGTGCAAGGGGGCTCAAGCCCCCCTACCTCTCCCAAAGGAGAAAGAAGGGAGAAGAAAGT
P-SETit.Rcc3-1:1:11     GGTGCAAGGGGGCTCAAGCCCCCCTACCTCTCCCAAAGGAGAAAGAAGGGAGAAGAAAGT
P-SETit.Rcc3-1:1:16     GGTGCAAGGGGGCTCAAGCCCCCCTACCTCTCCCAAAGGAGAAAGAAGGGAGAAGAAAGT
                        ************************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1      GAAGGAAGAAGAAACCCCCTATATTCTAATGCTACCTCCGCCACTGCTGATCAACACAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10     GAAGGAAGAAGAAACCCCCTATATTCTAATGCTACCTCCGCCACTGCTGATCAACACAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11     GAAGGAAGAAGAAACCCCCTATATTCTAATGCTACCTCCGCCACTGCTGATCAACACAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:16     GAAGGAAGAAGAAACCCCCTATATTCTAATGCTACCTCCGCCACTGCTGATCAACACAAC
                        ************************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1      ATTCTTAAAACCATTTCCTTGGCATTTGCGCATGTTACAAGGTACAAAAGAGCCAGCCCA
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ATTCTTAAAACCATTTCCTTGGCATTTGCGCATGTTACAAGGTACAAAAGAGCCAGCCCA
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ATTCTTAAAACCATTTCCTTGGCATTTGCGCATGTTACAAGGTACAAAAGAGCCAGCCCA
P-SETit.Rcc3-1:1:16     ATTCTTAAAACCATTTCCTTGGCATTTGCGCATGTTACAAGGTACAAAAGAGCCAGCCCA
                        ************************************************************
```

FIG. 10e

```
P-SETit.Rcc3-1:1:1      TATGCCAAGTTACTAAACTAAACTATGATCCACCATGGAGCGAGAACAAACGTCAACAGG
P-SETit.Rcc3-1:1:10     TATGCCAAGTTACTAAACTAAACTATGATCCACCATGGAGCGAGAACAAACGTCAACAGG
P-SETit.Rcc3-1:1:11     TATGCCAAGTTACTAAACTAAACTATGATCCACCATGGAGCGAGAACAAACGTCAACAGG
P-SETit.Rcc3-1:1:16     TATGCCAAGTTACTAAACTAAACTATGATCCACCATGGAGCGAGAACAAACGTCAACAGG
                        ************************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1      CATCAACCAATGCAGCAATCTTGATCGCTAGTACTGTCCGGCATTATATCTGAAACAAAT
P-SETit.Rcc3-1:1:10     CATCAACCAATGCAGCAATCTTGATCGCTAGTACTGTCCGGCATTATATCTGAAACAAAT
P-SETit.Rcc3-1:1:11     CATCAACCAATGCAGCAATCTTGATCGCTAGTACTGTCCGGCATTATATCTGAAACAAAT
P-SETit.Rcc3-1:1:16     CATCAACCAATGCAGCAATCTTGATCGCTAGTACTGTCCGGCATTATATCTGAAACAAAT
                        ************************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1      CCAGATCACCCATCTCATCACAGTCACATGCATTCATGGTCACGGGAACCGTTAGCAAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:10     CCAGATCACCCATCTCATCACAGTCACATGCATTCATGGTCACGGGAACCGTTAGCAAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:11     CCAGATCACCCATCTCATCACAGTCACATGCATTCATGGTCACGGGAACCGTTAGCAAAC
P-SETit.Rcc3-1:1:16     CCAGATCACCCATCTCATCACAGTCACATGCATTCATGGTCACGGGAACCGTTAGCAAAC
                        ************************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1      CACCAACTAATCAGCATTGCAACACTCTTCCTCCTATAAATGCAGCGAGCGGGGGACACC
P-SETit.Rcc3-1:1:10     CACCAACTAATCAGCATTGCAACACTCTTCCTCCTATAAATGCAGCGAGCGGGGGACACC
P-SETit.Rcc3-1:1:11     CACCAACTAATCAGCATTGCAACACTCTTCCTCCTATAAATGCAGCGAGCGGGGGACACC
P-SETit.Rcc3-1:1:16     CACCAACTAATCAGCATTGCAACACTCTTCCTCCTATAAATGCAGCGAGCGGGGGACACC
                        ************************************************************

P-SETit.Rcc3-1:1:1      ATAAACCATCACAGGCACTTAG
P-SETit.Rcc3-1:1:10     ATAAACCATCACAGGCACTTAG
P-SETit.Rcc3-1:1:11     ATAAACCATCACAGGCACTTAG
P-SETit.Rcc3-1:1:16     ATAAACCATCACAGGCACTTAG
                        **********************
```

FIG. 10f

```
P-SETit.Ssp1-1:1:1  TTCGCCCTTACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTATTCTACTGACCCAC
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  GGTTCACTCGTATGTTATCCATCCAGCTCAATTTTTCACGGATACCGCAAGCTTAACAGT
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  GGGTGACTGTGTAGGTGATCACTTGGATTTTGGGGTGAGCACCTTGAGTCCACCCACAAA
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  GGGTCTTATTATGCCAGTCTCAATAGTGGATTTCATGTGAGTTTCATTAGCATTAAATTC
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  TATGGTACATTAGCAATTTTGCTAACTTGGCAGGATTATTAAGAGAGGAGAAAGTTTC
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  ATTAGATGAGAGAGCAATTTCATCCCCATAAAACCCATCAGACTCAGTGCAATGAAACTG
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  TGCACGGAGATTGGCCTTAGAGGCTCTTGAATCACAATCGACCCGTCTTCCTACTGAAAA
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  TTCTCCAGAATGCACGCTATCAGAAGAGGAGCCCTCTAGTACCGTGGTTCGACTCTCCGTG
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  GGAGCAAATTAAAGTGATCTAGAATAAAAAAAATGTACAAAAAATAGGTTGGGTTTCTCCT
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  ACTAACTTCAGTCAAAAAAAAGATAGCTAAACAAGATAGCTCTTGCGTTGAGTGTATGGA
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ssp1-1:1:1  TAAATTGAGTTGGCCCGCCAGCTGCCTTCCCTTCTTAGATTATGTTTGGGGTTCTTTTC
P-SETit.Ssp1-1:1:2  ------------------------------------------------GGGTTCTTTTC
                                                                    **********
```

FIG. 11a

```
P-SETit.Ssp1-1:1:1      GTCATAGCGTATTTTTCACTCAACAATGTGTCTCCTTATCCCTTTCATCCATGAGTAATG
P-SETit.Ssp1-1:1:2      GTCATAGCGTATTTTTCACTCAACAATGTGTCTCCTTATCCCTTTCATCCATGAGTAATG
                        ************************************************************

P-SETit.Ssp1-1:1:1      GCTCTTGGAACATATCCTACTTTAGATAGGTGACAAATTCAGCTTAAAAAGATTTAGATC
P-SETit.Ssp1-1:1:2      GCTCTTGGAACATATCCTACTTTAGATAGGTGACAAATTCAGCTTAAAAAGATTTAGATC
                        ************************************************************

P-SETit.Ssp1-1:1:1      CACATCACCATATCACAACTTTACAGACTCTCTTTAATAAAGTGGAATGCGTATGATGTG
P-SETit.Ssp1-1:1:2      CACATCACCATATCACAACTTTACAGACTCTCTTTAATAAAGTGGAATGCGTATGATGTG
                        ************************************************************

P-SETit.Ssp1-1:1:1      ACCGATGCCTTCACATGTCTTATGGTGAACTTGTGATGATATTGTCACCCACGGTATCAA
P-SETit.Ssp1-1:1:2      ACCGATGCCTTCACATGTCTTATGGTGAACTTGTGATGATATTGTCACCCACGGTATCAA
                        ************************************************************

P-SETit.Ssp1-1:1:1      GAAAATACCAACAAGAAAAGTCACTTTTTTCCTTTTATTAAGTGCATATTTTGTTGCCAA
P-SETit.Ssp1-1:1:2      GAAAATACCAACAAGAAAAGTCACTTTTTTCCTTTTATTAAGTGCATATTTTGTTGCCAA
                        ************************************************************

P-SETit.Ssp1-1:1:1      CACATACCGTACAACCTAAGAAAATTAATCACTAAATGTTGAAATTGACTAGATACCATG
P-SETit.Ssp1-1:1:2      CACATACCGTACAACCTAAGAAAATTAATCACTAAATGTTGAAATTGACTAGATACCATG
                        ************************************************************

P-SETit.Ssp1-1:1:1      TCATGGCTTGGTTATCTAGATAATAATTTGCTTAGGAAAAGCAAAAATCATGCTAGAGCT
P-SETit.Ssp1-1:1:2      TCATGGCTTGGTTATCTAGATAATAATTTGCTTAGGAAAAGCAAAAATCATGCTAGAGCT
                        ************************************************************

P-SETit.Ssp1-1:1:1      ATATGATCTCTCAAGAGTATAAATAGGTCCCGGATATGTAGCCAATCT
P-SETit.Ssp1-1:1:2      ATATGATCTCTCAAGAGTATAAATAGGTCCCGGATATGTAGCCAATCT
                        ***********************************************
```

FIG. 11b

```
P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      GACTTTTCACGCTGAGAAACTGTCAGGAAGCTCAAACAAACACAGCCTATACAGTGATTC

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      TGTACCAATCAAACCACTCACAACTCACCAATGTACCTGTTTATTTTCCAAATCAACCAT

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      TGCTGTGGGGCTTGTGGGTTATGACTTATGAGTATGAGCAGTATTTTCCCCCCTGGAATG

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      CAAGTGGCAGATAGCTTCTGAGATCTACCATGCACCCTGGTAAAGCTCCTACCATTTTAT

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      TTGCAATAGTAGATGCATATAATTGATGGACACAGAGTTCTGAACCGTGAGATTTTCTTT

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      AACTTCAGAGTTCTGTCACTATGTTAACGTGGATCTGGAGTTTTGCAGGAACTGTGAAGA

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      AGGAACCGTACCTAAAACTAAAAGTCTCACGAAGACCAAATGGGCAAGCCAGACAGTCAG

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      AGAGACAGGGCTTCTTCGGCCAACTGGACAAGGGATGTGCCATCATGTGCTGAGAGATTA

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      CCAAATCCGCAATTTGCAGACGTGCCTTCTCAATCAGTTTGCACAAAGCGATAAGGTAAA

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      CAACCATTGGAGCATTGTTAACAGCAGCCTAGCATGGCAGGATGCGTCATCTGAATAATG

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      CGGAGGGCAGGACAGTAGGACAGGACACCTAATCCCTGCAAATTCTAGTGGCTCTGGGAC
```

FIG. 12a

```
P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      ACTGATCATGGCCCAAAAGTGCTAACCACTGCATTACTAAAACGTGTGGGTGTTGCGAGT

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      TCCAAGTTGGCTGTTGTCATGGAATGGTATGAAAATGCAAAAGATTCTCGTTGTTTTGTT

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      GAGAGTTAGTAAATTGGGATGACTTCGGCATGACAACAGCACAAACCTTACATATTTGGT

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      AAGACTTGCAACAAAAATCAAAAGAATGCTAGTAGATACCAACAAAAAGAAAAAACAGAG

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      CTAGCATGAACACTTCTTTGATCACAGTTGATCAAAGGTGTATGGCCCTCAGACAAAGCT

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      GTTGATGATGGTCAAACACTTTTGCTACCGAATATCGCAGTTGTCCTTTGGTACATTCAC

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      AAGTTTGATCTTATCATCACCATCAGAAGTTCAGAAAGTCTCGATGAAAACAAATGGAAA

P-SETit.Tip-1:1:1      ------------------------------------------------------------
P-SETit.Tip-1:1:4      TGAATACTGCTTACTTAGCTCAAATTCATATTCCGTTGTTACAGGATACTTAAAAAAGGT

P-SETit.Tip-1:1:1      ----------------------------------------------------TGTACTGTC
P-SETit.Tip-1:1:4      ACCAAAGGCTGTTCCTAATCATACGCTGAAGTCGTTGCCACCAATGGCAGCTGTACTGTC
                                                                  *********

P-SETit.Tip-1:1:1      ATATTGTCGTGGTTTTTCAATTGCTGTACCTGATGCAAACGTAATGGGTTTACTAATCTT
P-SETit.Tip-1:1:4      ATATTGTCGTGGTTTTTCAATTGCTGTACCTGATGCAAACGTAATGGGTTTACTAATCTT
                       ************************************************************
```

FIG. 12b

```
P-SETit.Tip-1:1:1  GCACCCGCCGGCTTCAAAATGAAGAGTGCTAATTTGGTCCACGTCACCATCACCGGTTCG
P-SETit.Tip-1:1:4  GCACCCGCCGACTTCAAAATGAAGAGTGCTAATTTGGTCCACGTCACCATCACCGGTTCG
                   ********** ****************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1  AACTGTCTAGAATGGCAGGCAAAGATGATTGGACAGGCATGCAGGGAAAAAGAGCACCGT
P-SETit.Tip-1:1:4  AACTGTCTAGAATGGCAGGCAAAGATGATTGGACAGGCATGCAGGGAAAAAGAGCACCGA
                   **********************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1  TGACGATGTATGCGAGTTCCCACCATTGCGAGCAATGATTATCAGCCACACGACTTACTC
P-SETit.Tip-1:1:4  TGACGATGTATGCGAGTTCCCACCATTGCGAGCAATGATTATCAGCCACACGACTTACTC
                   **********************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1  TTCAGAGCTAACCACTGCCATGCAGAGAAAAAAGTGAATCATATTGTCATGATCTACAACG
P-SETit.Tip-1:1:4  TTCAGAGCTAACCACTGCCATGCAGAGAAAAAAGTGAATCATATTGTCATGATCTACAACG
                   **********************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1  AAGTGAAACAATCAGGCATGCTAAAGTGCTGAAACTTTACTGATCTCTCATGTTGGACAA
P-SETit.Tip-1:1:4  AAGTGAAACAATCAGGCATGCTAAAGTGCTGAAACTTTACTGATCTCTCATGTTGGACAA
                   **********************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1  CAAAGAATACGGGAATACATCAGCAACGCAACTCTTGAGCTTTGCTTGCCGAATGACCAG
P-SETit.Tip-1:1:4  CAAAGAATACGGGAATACATCAGCAACGCAACTCTTGAGCTTTGCTTGCTGAATGACCAG
                   ********************************************** **********

P-SETit.Tip-1:1:1  CTAGAATTTCCAAGCATTTACAGAAACATGACTTTAAGTTTCAGAAAAACAAATACAAGG
P-SETit.Tip-1:1:4  CTAGAATTTCCAAGCATTTACAGAAACATGACTTTAAGTTTCAGAAAAACAAATACAAGG
                   **********************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1  CCACTAAATAAGCGTGTGGGGATAACATATCCTCCAGATGACAGGCAATCTGCAACTTGCAG
P-SETit.Tip-1:1:4  CCACTAAATAAGCGTGTGGGGATAACATATCCTCCAGATGACAGGCAATCTGCAACTTGCAG
                   **********************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1  CCATTCAAATGTACGATTAACAAAATATTTAAGCGCCACATGAGATAAATATATCCTCCAA
P-SETit.Tip-1:1:4  CCATTCAAATGTACGATTAACAAAATATTTAAGCGCTACATGAGATAAATATATCCTCCAA
                   ********************************** **********************
```

FIG. 12c

```
P-SETit.Tip-1:1:1       TTAGGGCCTTTAGTATTGTCATTAGCTCATAACCATGGTGCATCCTCACATGGACGCTGC
P-SETit.Tip-1:1:4       TTAGGGCCTTTAGTATTGTCATTAGCTCATAACCATGGTGCATCCTCACATGGACGCTGC
                        ************************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1       ATAAGAAGTTCATAATAGCAACAGACATATGAACAAAGCATGGTGCGCCTGCCCGGCCGG
P-SETit.Tip-1:1:4       ATAAGAAGTTCATAATAGCAACAGACATATGAACAAAGCATGGTGCGCCTGCCCGGCCGG
                        ************************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1       ACTAGCTAGTACTACCAATCATGGAATAAGCTAGTACCCTAAATGAAATTAAAATGGTTT
P-SETit.Tip-1:1:4       ACTAGCTAGTACTACCAATCATGGAATAAGCTAGTACCCTAAATGAAATTAAAATGGTTT
                        ************************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1       TTAGCGATTATCCACGCCGTCCAGAATACTCTAATCCACAAGTTGAGGCCGCCCATGAAG
P-SETit.Tip-1:1:4       TTAGCGATTATCCACGCCGTCCAGAATACTCTAATCCACAAGTTGAGGCCGCCCATGAAG
                        ************************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1       CCGCGAGAGGGCGACGCCATGTGTATAAAAGGGGCCTAAGCTGAGTGGACTTGCTGCATC
P-SETit.Tip-1:1:4       CCGCGAGAGGGCGACGCCATGTGTATAAAAGGGGCCTAAGCTGAGTGGACTTGCTGCATC
                        ************************************************************

P-SETit.Tip-1:1:1       AGATTAGT
P-SETit.Tip-1:1:4       AGATTAGT
                        ********
```

FIG. 12d

```
P-SETit.TubA2-1-1:1:2      TAGCGTAGCAGGCTAGCAGCCTGAACTCTCGGGTGATTCTGTGGCGAGTTAGCTTGCTCG
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      CTGCCTGCAATGGAGTGAATATTGGCAGTACGAAGTCACACGGGCAGGCAGAGATTTGGA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      ACATGGTGGAAACAAGAACCATCGGCATCGTTCTTCTGATCAATATAGTGATTACTGGAA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      GAATCAAGAACAGAATAAAACCAAGGCATCCTGGATCTACCATGTCAATCTTTGCTTTCA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      TCCTCGTCGTTTGGAGCGAGCCTGTTCTTGTTTGAGGCGCGCTCGACCGTGCCACGAAGT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      AACAGGTGCATGAGGTCTGCAGTCTGCACTAGAACTTCCCAGCTCCCAAATTCAACGAAA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      CTGAAAAAAGTCATTGGTAACATCAAAGTCTTGTCTTAGGATAGCTGCTGTTCTTGACGC
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      TGGTTAGATTTGTCCAATAAATTACATGACCAGCGCACATGTACTTGGTATTCGACTTGA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      TGATTTGTATGTACTGACGGACTTGAATAAAGTAGGGGGAATTAGGACTCAGAAGTCTAC
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      GATTTTTGGTCCAATATTTGATTGTGATGTTCAAAGTCGACGTCTCTTTCGAGACGAAAT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------
```

FIG. 13a

```
P-SETit.TubA2-1-1:1:2      TGTGATGCGTAGAACAAAAACGACGCAATTTCTTTTCAAAAGAAAAAGATTAGGGGCAGA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      ACAATTCAGGATCTGTTTGGCTGGACTTATAAGCCGGCTGAAAAGCTGAAACGGTTGATT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ------------------------------------------------------------


P-SETit.TubA2-1-1:1:2      TATTGTGAGAGAAAAACACTGTTTGGTGGCTGATAAGCTGAAACGAACAGGCTGTCAGTC
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      -----------------ACTGTTTGGTGGCTGATAAGCTGAAACGAACAGGCTGTCAGTC
                                           *****************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      ATTAGGCTGCCGGCTCTGGAACAGTGCGCCATCAAGAGATCACCCGAACCATGTTGAGCT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ATTAGGCTGCCGGCTCTGGAACAGTGCGCCATCAAGAGATCACCCGAACCATGTTGAGCT
                           ************************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      CATCAACGTGCGCCGCTGTTGTGCTCATTGGTGTCGCGGTCGTGGCTGGCGCGCATCTTT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      CATCAACGTGCGCCGCTGTTGTGCTCATTGGTGTCGCGGTCGTGGCTGGCGCGCATCTTT
                           ************************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      CGTTGCGTCTTGTCATGGATTATCCACGACGGCAGTGTCCTGTTGTTTATGATGACGGCA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      CGTTGCGTCTTGTCATGGATTATCCACGACGGCAGTGTCCTGTTGTTTATGATGACGGCA
                           ************************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      CTTGATTCGCCATGGATGGTGAAAACGAAATCGAAGTGCGGTCATTTTTTATTTTACCAG
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      CTTGATTCGCCATGGATGGTGAAAACGAAATCGAAGTGCGGTCATTTTTTATTTTACCAG
                           ************************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2      ATGACGTGGTTGGTGACCTGAGAGGAACAGACATGAGAAGATGAGATCAGCAGCTCAATT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3      ATGACGTGGTTGGTGACCTGAGAGGAACAGACATGAGAAGATGAGATCAGCAGCTCAATT
                           ************************************************************
```

FIG. 13b

```
P-SETit.TubA2-1-1:1:2  CCCACATTGACAGACGACCTTTGGAGCAGTACAAGAGACCCAAATGAAGAATAGTGCAAA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3  CCCACATTGACAGACGACCTTTGGAGCAGTACAAGAGACCCAAATGAAGAATAGTGCAAA
                       **********************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2  TTACAGAGTATATTAGAACACGAGAATTATTAAGTTTTACTCGAGGTCAATGAAAGAATT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3  TTACAGAGTATATTAGAACACGAGAATTATTAAGTTTTACTCGAGGTCAATGAAAGAATT
                       **********************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2  TAGGACTATTCAGAGCACAGGCTGTGTTCAAGTCCTGCATGAACCAGAGAAAGTTCCCAC
P-SETit.TubA2-1-1:1:3  TAGGACTATTCAGAGCACAGGCTGTGTTCAAGTCCTGCATGAACCAGAGAAAGTTCCCAC
                       **********************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2  CAAGGCCTCCATCAGAGGAACGAATTTGCCTGGAACTCCATCACTCACCAGTCACCACTC
P-SETit.TubA2-1-1:1:3  CAAGGCCTCCATCAGAGGAACGAATTTGCCTGGAACTCCATCACTCACCAGTCACCACTC
                       **********************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2  ACCACTTACCAGCCTAATAAAGCGTAGCAGACAATTTGGAGTAGACGATCATCATGTGCA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3  ACCACTTACCAGCCTAATAAAGCGTAGCAGACAATTTGGAGTAGACGATCATCATGTGCA
                       **********************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2  GTCTCATAGGCCCTCTTCTAGGAATAACCGTATTTGATAGCCAATCCACCTATGTGGTGA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3  GTCTCATAGGCCCTCTTCTAGGAATAACCGTATTTGATAGCCAATCCACCTATGTGGTGA
                       **********************************************************
```

FIG. 13c

```
P-SETit.TubA2-1-1:1:2  TTTTTTTTTCCTTTGTCCATCGGGGTCGCTTTCCATCCGACGTGTCTGCAGTGTAGCGCA
P-SETit.TubA2-1-1:1:3  TTTTTTTTTCCTTTGTCCATCGGGGTCGCTTTCCATCCGACGTGTCTGCAGTGTAGCGCA
                       ************************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2  ATCCATCTGTCGCTTTCTGCTTTCTGATGAACGTTCCGGTTGACGCCGCTAAGCTGCCTT
P-SETit.TubA2-1-1:1:3  ATCCATCTGTCGCTTTCTGCTTTCTGATGAACGTTCCGGTTGACGCCGCTAAGCTGCCTT
                       ************************************************************

P-SETit.TubA2-1-1:1:2  GTCCTCCTTTTTCTCCCGTCTGCACAGGGAGGGG
P-SETit.TubA2-1-1:1:3  GTCCTCCTTTTTCTCCCGTCTGCACAGGGAGGGG
                       **********************************
```

FIG. 13d

```
P-SETit.Ubq1-1:1:1  ACTGCCGCGACACGCCTCACTGGCGGGAGGGCTCCGAGCGCTCTCTCCCCGGCGGCCGGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  GGAGCAGCGATCTGGATTGGAGAGAATAGAGGAAAGAGAGGGAAAAGGAGAGAGATAGCG
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  CAAAGAGCTGAAAAGATAAGGTTGTGCGGGCTGTGGTGATTAGAGGACCACTAATCCCTC
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  CATCTCCTAATGACGCGGTGCCCAAGACCAGTGCCGCGGCACACCAGCGTCTAAGTGAAC
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  TTCCGCTAACCTTCCGGTCATTGCGCCTGAAAGATGTCATGTGGCGAGGCCCCCCTCTCA
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  GTAGATTGCCAACTGCCTACCGTGCCACTCTTCCATGCATGATTGCTCCCGTCTATCCCG
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  TTTCTCACAACAGATAGACAACAGTAAGCATCACTAAAGCAAGCATGTGTAGAACCTTAA
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  AAAAAGGCTTATACTACCAGTATACTATCAACCAGCATGCCGTTTTTGAAGTATCCAGGA
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  TTAGAAGCTTCTACTGCGCTTTTATATTATAGCTGTGGACCTGTGGTAACCTTTCTCTTT
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  TGGCGCTTGCTTAATCTCGGCCGTGCTGGTCCATGCTTAGGCACTAGGCAGAGATAGAGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1  CGGGGGTGAATGGGGCTAAAGCTCAGCTGCTCGAGGGGCCGTGGGCTGGTTTCCACTAGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3  ----------------------------------------------------------
```

FIG. 14a

```
P-SETit.Ubq1-1:1:1      CTACAGCTGTGCCACGTGCGGCCGCGCAAGCCGAAGCAAGCACGCTGAGCCGTTGGACAG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1      CTTGTCATAATGCCATTACGTGGATTACACGTAACTGGCCCTGTAACTACTCGTTCGGCC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ------------------------------------------------------------

P-SETit.Ubq1-1:1:1      ATCATCAAACGACGACGTCCGCTAGGCGACGACACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      --------------------------------CACGGGTAATGCACGCAGCCACCCAGGC
                                                         ****************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      GCGCGCGCTAGCGGAGCACGGTCAGGTGACACGGGCGTCGTGACGCTTCCGAGTTGAAGG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTCACACGA
P-SETit.Ubq1-1:1:3      GGTTAACGCCAGAAACAGTGTTTGGCCAGGGTATGAACATAACAAAAAATATTCACACGA
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
P-SETit.Ubq1-1:1:3      AAGAATGGAAGTATGGAGCTGCTACTGTGTAAATGCCAAGCAGGAAACTCACGCCCGCTA
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGATTG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ACATCCAACGGCCAACAGCTCGACGTGCCGGTCAGCAGAGCATCGGAACACTGGTGATTG
                        ************************************************************
```

FIG. 14b

```
P-SETit.Ubq1-1:1:1      GTGGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGTGGCCCGTGGCCCTGCTG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      GTGGAGCCGGCAGTATGCGCCCCAGCACGGCCGAGGTGGTGGTGGCCCGTGGCCCTGCTG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      TCTGCGCGGCTCGGGACAACTTGAAACTGGGCCACCGCCTCGTCGCAACTCGCAACCCGT
P-SETit.Ubq1-1:1:3      TCTGCGCGGCTCGGGACAACTTGAAACTGGGCCACCGCCTCGTCGCAACTCGCAACCCGT
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      TGGCGGAAGAAAGGAATGGCTCGTAGGGGCCCGGGTAGAATCGAAGAATGTTGCGCTGGG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      CTTCGATTCACATAACATGGGCCTGAAGCTCTAAAACGACGGCCCGGTCGCCGCGCGATG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      CTTCGATTCACATAACATGGGCCTGAAGCTCTAAAACGACGGCCCGGTCGCCGCGCGATG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      GAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCACCG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      GAAAGAGACCGGATCCTCCTCGTGAATTCTGGAAGGCCACACGAGAGCGACCCACCACCG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      ACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAACACGGCCGGCGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCAG
P-SETit.Ubq1-1:1:3      ACGCGGAGGAGTCGTGCGTGGTCCAACACGGCCGGCGGGCTGGGCTGCGACCTTAACCAG
                        ************************************************************

P-SETit.Ubq1-1:1:1      CAAGGCACGCCACGACCCGCCCCGCCCTCGAGGCATAAATACCCTCCCATCC
P-SETit.Ubq1-1:1:3      CAAGGCACGCCACGACCCGCCCCGCCCTCGAGGCATAAATACCCTCCCATCC
                        **************************************************
```

FIG. 14c

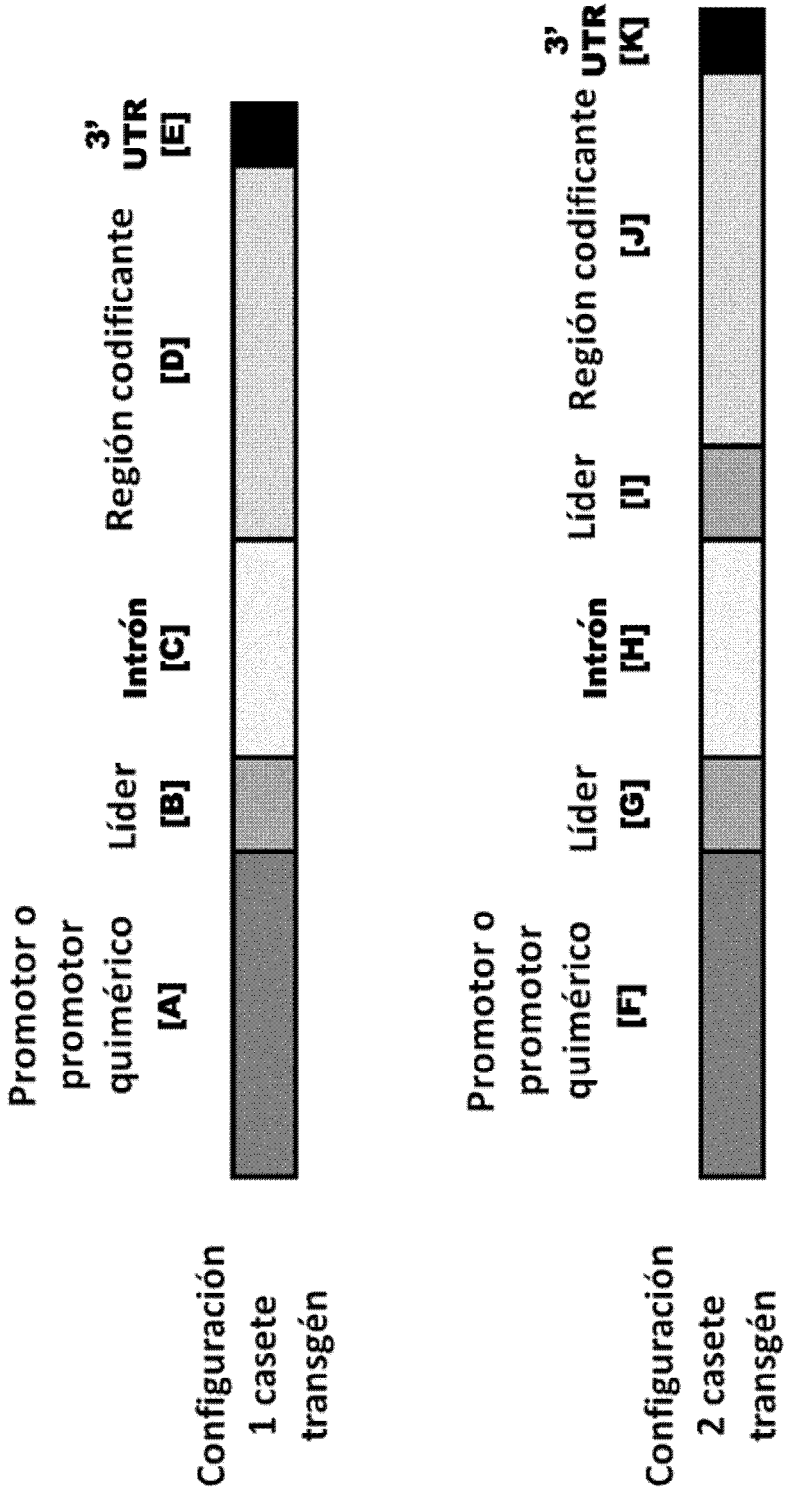
Configuración 1 casete transgén
Promotor o promotor quimérico [A]
Líder [B]
Intrón [C]
Región codificante [D]
3' UTR [E]
Configuración 2 casete transgén
Promotor o promotor quimérico [F]
Líder [G]
Intrón [H]
Líder [I]
Región codificante [J]
3' UTR [K]

FIG. 15